EXPERIMENTELLE, AUTOIMMUNE TUBULO-INTERSTITIELLE NEPHRITIS

Albert Krieger

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

E X P E R I M E N T E L L E, A U T O I M M U N E T U B U L O - I N T E R S T I T I E L L E N E P H R I T I S

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Albert Krieger
aus
München
1979

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München .

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. G. H. THOENES
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BRENDEL
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 17.7.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Abkürzungen

BM	Basalmembran
CFA	Complettes Freund'sches Adjuvans
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
IF	Immunfluoreszenz
MHS	Major Histocompatibility System
PBS	Phosphat-gepuffertes Kochsalz
RT 1	Bezeichnung des Haupthistokompatibilitäts-Locus der Ratte
TBM	Tubuläre Basalmembran
TIN	Tubulo - interstitielle Nephritis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0015

Inhaltsverzeichnis Seite

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 6

1. Versuchstiere, tierexperimentelle Verfahren 6
2. Antigenherstellung und -zubereitung 8
3. Immunchemische Materialien und Verfahren 10
4. Immunhistologie, Histologie 12
5. Nierenfunktionsmessungen 13
6. Therapeutica 14

III. DIE PATHOGENESE DER TUBULO-INTERSTITIELLEN NEPHRITIS (TIN) 15

A. Induktionsphase (O. - 13. Tag), Morphologie und Immunhistologie 15
   1. Versuchsanordnung 15
   2. Ergebnisse 16
   3. Zusammenfassung 32

B. Restitutionsphase (3. Woche - 8. Monat), Morphologie, Immunhistologie und Funktion 33
   1. Versuchsanordnung 33
   2. Ergebnisse 34
   3. Zusammenfassung 44

C. Untersuchungen zur Spezifität der TBM-Antikörper 45
   1. Spezifität für Schafnieren 45
   2. Spezifität der Ratten-Nieren-fixierten Antikörper 45
   3. Spezifität der Complementfixierung an der TBM 45
   4. Übertragbarkeit der Serumantikörper gegen TBM 47

IV. ASPEKTE DER GENETISCHEN DISPOSITION ZUR TIN-ERKRANKUNG 49
1. Versuchsbegründung 49
2. Ergebnisse 50
A. Stammabhängigkeit und genetische Segregation der Krankheitsinzidenz 50
B. Verfügbarkeit des TBM-Antigen bei verschiedenen Stämmen und deren genetische Segregation 56
C. Kompetenz zur Antikörperbildung bei verschiedenen Stämmen 58
3. Zusammenfassung 59
V. MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER TUBULO-INTERSTITIELLEN NEPHRITIS 61
1. Versuchsbegründung 61
2. Ergebnisse 64
3. Zusammenfassung 69
VI. DISKUSSION 71
VII. ZUSAMMENFASSUNG 79
LITERATURLISTE 81

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit Jahrzehnten (34, 37) haben sich Nephrologen und Immunologen mit der Immunpathogenese glomerulärer Nierenerkrankungen beschäftigt. Die glomeruläre, kapilläre Basalmembran wurde als Zielort immunologischer Reaktion und als Ausgangspunkt der Erkrankung erkannt (32). Die Glomerulonephritisforschung hat über lange Zeit das Feld beherrscht, was zweifellos durch das Überwiegen der glomerulären Erkrankungen im Rahmen der nicht-bakteriellen Entzündungen der Niere begründet ist. Es dürfte nicht nur eine Spekulation sein, daß die funktionelle Überordnung des Glomerulus über tubuläre oder interstitielle Strukturen auch eine besondere Prädilektion des Glomerulus für pathogene Ereignisse bedeutet. Die Forschungen der letzten acht Jahre und die vorliegenden eigenen Ergebnisse haben jedoch zu der Erkenntnis geführt, daß das Interstitium der Niere, ebenso wie die Glomeruli, einer akuten selektiven und schwerwiegenden Pathogenese zugänglich ist.

Wir wissen von der Immunpathogenese der Glomerulonephritis beim Menschen, daß die direkte, membrantoxische antikörper-vermittelte Reaktion (Typ II der Immunreaktionen) seltener und der indirekte Immundepot-vermittelte Mechanismus (Typ III) häufiger vorkommt. Beide pathogenetischen Wege spielen sich jedoch im Bereich der Basalmembran ab. Diese Situation von Kapillaren in enger Relation zur (Tubulus) Basalmembran ist beim Interstitium ebenso gegeben wie am Glomerulus. Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß der tubulo-interstitielle Bereich auf die gleiche Weise erkranken kann wie der Glomerulus (1). Wenn man unter diesem Gesichtspunkt die Beobachtungen aus der Nierenpathologie des Menschen zusammenfaßt, kommt man - immer unter der Voraussetzung, daß erst in letzter Zeit dem Interstitium

größere Aufmerksamkeit geschenkt wird - zu folgenden immunhistologischen Manifestationen (Tabelle I), die nicht mit offensichtlichen morphologischen Veränderungen einhergehen müssen.

Tabelle I: Vorkommen tubulo-interstitieller Immunglobulinablagerungen (nach Lehman et al.) (31)

		Literatur[***]
a) linear(TBM) bei:	- Anti-GBM-GN(70%);[*](50%)	(2)
	- Goodpasture-S.(85%)	
	- Transplantatabstoßung(5%)	
	- Medikamentöser Therapie: (Methicillin	(4)
	Diphenylhydantoin)	(22)
	- ferner:-idiopathisch	(3)
	-rapid-progress.-poststrepto.GN	(41)
b) granulär bei:	- System.Lupus erythem.(50-70%)	
	- Transplantatabstoßung	
	- Immunkomplex - GN(5%)	
	- ferner: Cryoglobulinämie	
	Sjögren - S.	(63)
	G.v.H. - Reakt.	
c) linear und granulär bei:	- Fanconi-Syndrom	(61)
	- Milch-Allergie	

---

[*] Häufigkeit in Klammer

[***] Angaben weiterer Originalliteratur

Zusammenfassend kann man sagen, daß Tubulusmembranantikörper im wesentlichen im Zusammenhang mit dem autoimmunen Goodpasture-Syndrom und Immundepots entlang von Tubulusbasalmembranen beim autoimmunen Lupus erythematosus am häufigsten vorkommen. In beiden Fällen besteht bisher wenig Klarheit darüber, inwieweit die immunologischen Manifestationen auch entscheidende primäre morphologische und funktionelle Folgen haben, da die glomeruläre Erkrankung im Vordergrund steht und prinzipiell am zugehörigen Nephron Sekundärfolgen haben kann. Ein isoliertes Vorkommen einer offensichtlich immunologisch begründeten interstitiellen Nephritis beim Menschen ist, soweit bisher bekannt ist, selten. Die interstitielle Nephritis allgemein hat beim Menschen eine Häufigkeit von nur 1,7 % auf 25.000 Autopsien (65).

Auf der Suche nach tierexperimentellen Modellen für interstitielle Erkrankungen bestand zunächst die ähnliche Situation wie für den Menschen beschrieben: Autoimmunisierung mit Nierengewebe führt in erster Linie zur Glomerulonephritis (17), oder interstitielle Manifestationen erwiesen sich nicht frei von glomerulären Veränderungen (59). Die Pathogenese durch Immunkomplexablagerung stand dabei im Vordergrund. Bemerkenswerterweise ist kein Modell bekannt geworden, das auf Immunkomplexbasis zu einer isolierten interstitiellen Nephritis führt (24). Im Gegensatz dazu hat sich erst im letzter Zeit gezeigt, daß die tubuläre Basalmembran eine hohe antigene Spezifität besitzt und sich deutlich von der glomerulären Membran unterscheidet. Durch bessere Reinigung des tubulären Basalmembranantigen ist eine selektive tubulo-interstitielle immunologische Reaktion induzierbar, bei der die Glomeruli unberührt bleiben.

Das Modell der tubulointerstitiellen Nephritis vom Anti-

TBM-Typ wurde zum ersten Mal 1971 von Steblay und Rudofsky (54) beschrieben: Die Autoren isolierten aus Kaninchennieren die Basalmembranfraktion. Diese emulgierten sie zusammen mit Freund's complettem Adjuvans und injizierten das Gemisch in Meerschweinchen. Nach etwa 4 Wochen entwickelte die Hälfte der so immunisierten Tiere eine tubulo-interstitielle Nephritis (TIN) mit einer linearen Fluoreszenz der Tubulusbasalmembran im Bereich der Rinde. In weiteren Versuchen 1974 von Lehman et al. (30) wurde die Basalmembran aus Rindernieren durch differenzierte Aufarbeitung in verschiedene Präparationen unterteilt, wobei auch eine relativ reine TBM-Fraktion zur Anwendung kam. Auch damit ließ sich beim Meerschweinchen eine TIN induzieren, die aber fluoreszenzmikroskopisch nicht frei von glomerulären Befunden war. Derartig komplexe Situationen treten bei Ratten nicht auf, wenn mit heterologen TBM-Präparaten immunisiert wird (28).

Die Ratte verhält sich im Hinblick auf die zur Diskussion stehenden Nierenerkrankungen anders als andere Spezies. Glomeruläre Autoimmunität erscheint unverhältnismäßig schwierig induzierbar, verglichen mit anderen Spezies(53). Tubuläre Basalmembran-Autoimmunität ist nicht nur durch Immunisierung mit heterologem Basalmembranmaterial induzierbar, sondern auch durch allogene Nierentransplantation (29), was Anknüpfungsmöglichkeiten an ähnliche Beobachtungen beim Menschen bietet (25, 62). Derartige transplantationsinduzierte tubulo-interstitielle Reaktionen aber sind an bestimmte histogenetisch definierte Stämme gebunden, die in Inzucht zur Verfügung stehen. Es hat sich gezeigt, daß die TIN überhaupt nur unter bestimmten genetischen Voraussetzungen auftritt (28), womit die wichtige Frage der Erkrankungsdisposition aufgeworfen wird.

Vor dem Hintergrund der ungeklärten Problematik chronischer interstitieller Entzündungen der Niere beim Menschen haben wir uns deshalb die Aufgabe gestellt, das tierexperimentelle Modell der tubulo-interstitiellen Nephritis so umfassend zu erarbeiten, daß es zur Grundlage für weiterführende Versuche bei der Erforschung chronisch-interstitieller Veränderungen werden kann. Die Problemstellung gliedert sich in folgende Punkte:

1. Induktion einer reinen tubulo-interstitiellen Nephritis durch Autoantikörper gegen Tubulusbasalmembran
2. Beschreibung der morphologischen, immunologischen und klinischen Merkmale der Erkrankung
3. Untersuchung der genetischen Disposition zur Erkrankung
4. Therapeutische Einflußmöglichkeiten
5. Ausblicke auf weitere experimentelle Modelle

Das experimentelle Konzept dieser Arbeit ist wie folgt zusammenzufassen:
Ratten verschiedener, histogenetisch definierter Inzuchtstämme werden unter verschiedenen Adjuvansbedingungen mit heterologer, vom Schaf stammender TBM-Fraktion einmalig immunisiert. Das Eintreten der Nierenerkrankung wird in zwei Zeitintervallen untersucht: Induktionsphase bis 2 Wochen nach Immunisierung und Restitutionsphase bis zu 8 Monaten. Da die experimentelle TIN eine akute Erkrankung ist, werden die Untersuchungen über die genetische Disposition an F_1- und F_2-Hybriden verschiedener Stämme auf die Induktionsphase, bzw. frühe Restitutionsphase beschränkt. Ein Behandlungsversuch der Erkrankung mit Azathioprin, Cyclophosphamid und Prednison bezieht sich auf einmalig immunisierte Tiere.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere, tierexperimentelle Verfahren

Alle in den Versuchen eingesetzten Ratten sind Inzuchtratten, die nach Histokompatibilitätsmerkmalen des RT1-Systems genetisch definiert sind (15):

Tabelle II: Haplotypen der verwendeten Inzuchtrattenstämme

Haplotyp (RT1)	Rattenstämme (Abkürzungen)
a	ACI, AVN, DA, LEW.1A
d	BDV, LEW.1D
e	BD VII
l	AS, BS, LEW
n	BN, LEW.1N
w	LEP, LOU
?	COP

Der Stamm BN diente als hauptsächlicher Versuchsstamm, bei dem die tubulo-interstitielle Nephritis gut erzeugt werden kann.

Die Tiere wurden unter besonderen hygienischen Vorsichtsmaßnahmen im laborzugehörigen Tierstall gehalten oder vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg in spezifisch pathogen-freiem Zustand bezogen. Die Hybriden wurden im eigenen Stall bzw. in Freiburg gezüchtet. Die Typisierung der F_2-Hybriden wurde mit Hilfe der Hämagglutinationsmethode mit hyplotyp-spezifischen Antiseren freundlicherweise von Dr. E. Günther, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, durchgeführt.

Für die Versuche wurden Tiere beiderlei Geschlechts im Alter von circa 3 Monaten ausgewählt, falls nicht spezielle Aspekte (s. Text) eine Änderung diesbezüglich erforderlich machten. Während der Versuche wurden alle Tiere im gleichen Raum bei möglichst konstanten klimatischen Bedingungen mit vitaminangereichertem Trockenfutter und Wasser ad libitum gehalten.

Betäubung: Alle Manipulationen, bis auf i.p.-Injektionen, die ohne Narkose durchgeführt wurden, geschahen in Inhalationsnarkose mit Narkoseäther der Fa. Hoechst.

Immunisierung erfolgte in beide hintere Fußsohlen mit Kanülen des Kalibers 12 oder 17. Dabei wurde auf einen möglichst langen Stichkanal geachtet, damit die Antigenzubereitung nicht zurücklaufen konnte.

Nierenbiopsien, Nephrektomie, Entblutung: Nach Transrektalschnitt wurde unter Schonung der Därme die Niere freigelegt. Für die Biopsie wurde zuerst die Nierenkapsel über dem seitlichen unteren Nierenpol gespalten und dann eine keilförmige Resektion vorgenommen. Nach Adaptation der Schnittränder wurde die Kapsel mit 9 - 0 Faden in Knopfnaht verschlossen. Für die Nephrektomie wurde die Niere bis auf den Gefäßpol freipräpariert, anschließend mit 2 - 0 Leinenzwirn A. und V.renalis zusammen mit dem Ureter unterbunden und dann die Niere reseziert. Entblutungen erfolgten von der iliakalen Bifurkation der Bauchaorta. Im Bedarfsfalle wurden die Bauchdecken einschichtig mit 2 - 0 Leinenzwirn verschlossen.

Blutabnahme, i.v.-Injektion: Für beide Eingriffe wurde von der Leistenbeuge aus die V.femoralis aufgesucht, Punktion mit 18er Kanüle, Entnahme von jeweils 0,5 ml Blut, einschichtiger Nahtverschluß.

Makroskopische Fotographie: MEDICAL-Objektiv NIKON (mit eingebautem Ringblitz), dankenswerterweise leihweise überlassen von Dr. Chüden, HNO-Klinik, TU München. NIKON-Kamera, freundlicherweise leihweise Fa. Foto-Elgas, München; Kodachrome-Film 15°DIN.

2. Antigenherstellung und -zubereitung

Die Präparation der Tubulusbasalmembranen (TBM) erfolgte aus Nieren frisch geschlachteter Schafe. Sie wurden vom örtlichen Schlachthof beschafft und bis zur Weiterverarbeitung bei -60° C, luftdicht in Plastiktüten eingeschweißt, aufbewahrt.

Für die Nierenaufarbeitung wurden die Methoden, die für die BM-Gewinnung anderenorts erstellt wurden (11, 26, 35, 52), berücksichtigt.

Die gesamte Aufarbeitung erfolgt bei Temperaturen um 4° C. Gewonnen werden die Tubuli der Rinde. Die längs halbierten Nieren werden dazu mit einer gebogenen Schere in einer Breite von ca. 5 mm entrindet und anschließend grob zerkleinert. Von dem so erhaltenen Material wird das Feuchtgewicht festgestellt. In ca. 40 g-Portionen wird dieses Material unter leichtem Druck auf einem Edelstahlprüfsieb, Vertrieb Fa. Bachofer, Reutlingen, (Maschendurchmesser: 125 u) durchgesiebt. Dabei ist darauf zu achten, daß mit reichlich isotoner Kochsalzlösung nachgespült wird und das Sieb vor jedem Arbeitsgang gereinigt wird. Durch dieses Vorgehen bleibt auf dem Sieb die Tubulusfraktion zurück, während die meisten Glomeruli und freien Zellen durch die Siebschlitze rutschen. Die Tubulusfraktion wird vom Sieb abgespült und in einem Potter-Elveyem-Apparat (Glas-

Homogenisator) weiter zerkleinert. Die erhaltene Suspension wird 15 Min. bei 400 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und so lange in kalter Kochsalzlösung gewaschen, bis der Überstand klar ist. Die jetzt vorliegenden Tubuli werden in dünner Suspension und in einzelnen Portionen zu 30 ml mit einem Ultraschallgerät (Fa. Branson, Typ B 12) mit Hilfe einer Mikrospitze, bei Leistungsregler-Stufe 5, 3 Min. lang behandelt. Die gewonnenen BM-Fragmente in 0,15 m-NaCl-Lösung werden anschließend durch langsames Hinzutropfen einer 5 m NaCl-Lsg. auf 1-molare Endkonzentration gebracht, um restliche zelluläre Elemente aufzulösen. Die nun vorliegenden tubulären BM werden 10 Min. bei 3000 g in der Kühlzentrifuge sedimentiert und in isotoner NaCl-Lösung gewaschen, bis der Überstand klar ist. Das Material wird am Ende durch Aufnahme in Aqua destillata salzfrei gemacht. Das im Sediment weißlich erscheinende BM-Material wird gefriergetrocknet und gewogen. Die Gewichtsrelation Nierenrindenfeuchtgewicht zu lyophilisiertem BM-Material beträgt etwa 1000 : 1. Die pulverige Schaf-TBM wird trocken bei -30° C aufbewahrt.

Zur Injektion wird das TBM-Präparat in geeignetem, versuchsabhängigen Volumen einer kalten 0,9%igen NaCl-Lösung möglichst homogen suspendiert und dann mit der gleichen Menge Completten Freund's Adjuvans (CFA) (Fa. Difco Bacto, No. 0638-60) emulgiert. Der Ansatz und die Emulgierung erfolgt direkt in einer 5- oder 10-ml-Luer-Lockspritze (Fa. Pharmaseal Lab.), die über einen Dreiwegehahn (Pharmaseal) mit einer zweiten Spritze verbunden ist. Durch geeignete Stellung des Dreiwegehahns kann die Flüssigkeit hin und her gespült werden, bis eine stabile Emulsion entsteht, die bei Prüfung auf kaltem Wasser nicht auseinander läuft. In 0,5 ml Emulsion sind 4 mg Schaf-TBM enthalten. Diese Menge wird je zur Hälfte tief in beide hintere Fußsohlen der Tiere injiziert. Die Emulsionsbereitung erfolgt un-

mittelbar vor jeder Applikation bei Temperaturen von etwa 4^{O} C. Die Adjuvanskontrollen werden in gleicher Weise ohne TBM versorgt. Das Emulgat kann aus einer der beiden Spritzen direkt injiziert werden. Für zusätzliche Immunstimulation wurde in einzelnen Gruppen B.pertussis-Suspension verwendet, die 3 x 10^{10} Keime pro ml enthielt und freundlicherweise kostenlos von der Fa. Behring-AG, Marburg zur Verfügung gestellt wurde. Pro Tier wurden davon 0,5 ml in die Muskulatur der Hinterläufe appliziert.

3. Immunchemische Materialien und Verfahren

Für die Immunhistologie (s.a. dort) wurden FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markierte Antiseren verwendet. Als Anti-Ratten IgG wurde FITC goat-anti-rat IgG der Fa. Hyland, und später, wegen Produktionseinstellung dieses Antiserums, FITC rabbit-anti-rat IgG der Fa. Cappel käuflich erworben. Anti-Ratten Complement (C3) wurde im eigenen Labor hergestellt (Methoden: Clark, Shepard (6) Mardiney, Müller-Eberhard (36)): Kaninchen wurden mit Rattencomplement-Zymosan-Komplex (s.a. unter C3-Absorption), emulgiert in inkompletten Freund'schen Adjuvans, immunisiert und nach 2 Monaten entblutet. Aus dem gewonnenen Serum wurde durch mehrfache Fällung bei 50 %iger Ammoniumsulfatsättigung die Globulinrohfraktion gewonnen und gegen 0,01 m K-Phosphat-Puffer, pH 8,0, dialysiert, Mit dem Dialysat wurde zum Zwecke der IgG-Gewinnung eine DEAE-Cellulose Säule unter gleichen Pufferbedingungen beschickt. Aus der mit obigem Puffer eluierten Proteinlösung wurde mit 0,025 m Carbonat Bic arb. Puffer, pH 9,2, eine 1 %ige Lösung erstellt. Diese wurde anschließend gegen eine Lösung von 0,2 mg pro ml FITC (Fa. BBL, USA), in Bicarbonatpuffer zum Zwecke der Fluoreszenzmarkierung dialysiert. Auf einer kleinen Säule

mit Sephadex G 25-Gel 0,14 m NaCl 0,01 m K-Phosphatpuffer, pH 7,3, wurde FITC-markiertes Kaninchen IgG von ungebundenem Farbstoff, der auf der Säule verbleibt, getrennt. Geringe Mengen von begleitenden Antikörpern gegen Ratten IgG wurden durch Affinitätschromatographie mit CnBr-aktivierter Sepharose 4B, die zuvor mit Ratten IgG beladen worden war, entfernt (8). Das Eluat wurde als 1 %ige Lösung eingestellt. Eine abschließende Testung des Materials in der Immunelektrophorese zeigte eine einzelne C3-Bande gegen Rattenvollserum.

Alle Fluoreszenzseren wurden zur Herstellung einer optimalen Gebrauchsverdünnung an positivem Nierengewebe getestet.

Absorption von Anti-Ratten C3 an Nierenhomogenat und C3-Zymosan-Komplex: Rattennierenhomogenat wurde durch Zerkleinerung von Rattennieren mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra Turrax^{R}, TP 18/10) hergestellt. Das gewaschene Sediment wurde 1 : 1 (V : V) mit FITC-IgG-anti-Ratten-C3 versetzt und unter ständigem Rühren 1 hr bei 37^{o} C inkubiert. Das absorbierte Reagens wurde durch Zentrifugieren wiedergewonnen.

C3-Zymosankomplex wurde hergestellt, indem 5 ml frisches Rattenserum und 200 mg Zymosan (Fa. Schwarz u. Mann, USA) bei 37^{o} C für 1 hr inkubiert und die Suspension 5-mal in isotonem Veronalpuffer, pH 7,6, gewaschen wurde. Zur Absorption wurde ein Gemisch von FITC-anti-Ratten-C3 und C3-Zymosankomplex im Verhältnis 1 : 2 (V : V) angesetzt und wie oben weiterbehandelt.

Antikörperelution aus Nierengewebe (Lehman et al. (28): Nieren von TBM-immunisierten Tieren (Stamm BN) mit immunhistologisch positiven Tubulusbasalmembranen wurden mit

dem Ultra-Turrax kurz homogenisiert und die Gewebebestandteile durch Zentrifugieren mehrfach mit PBS gewaschen. Das Sediment wurde mit 0,02 m Citratpuffer, pH 3,2, im Verhältnis 10 Teile Puffer zu einem Teil Sediment 1 hr bei 22° C unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation erfolgte sofortige Neutralisation mit 0,1 n NaOH, Einengung und Dialyse gegen PBS in der Unterdruckdialyse; Testung auf Antikörper mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) an Nierengewebe.

4. Immunhistologie, Histologie

Nierengewebe wurde unmittelbar nach Entnahme auf Korkplättchen verbracht und in tiefgekühltem Isopentan schnell tiefgefroren. Bis zur Verarbeitung wurde das Gewebe, luftdicht in Plastikfolie, bei -70° C aufgehoben. 4 u-dicke Gefrierschnitten wurden am Kryostat-Mikrotom hergestellt, alle Schnitte in kaltem Luftstrom getrocknet und ohne weitere Fixierung bearbeitet. Für die direkte Immunfluoreszenz (IF) wurden die vorher in PBS gewässerten Präparate mit FITC-anti IgG und -anti C3 betropft und 30 Min. in eine feuchte Kammer verbracht. Anschließend Abspülen der Schnitte und 60 Min. wässern in PBS. Eindecken der Präparate mit PBS-gepufferter Glycerinlösung und Deckgläschen. Mit der indirekten Immunfluoreszent (IIF) wurden Anti-BM-Antikörper nachgewiesen: Gefrierschnitte mit Testserum inkubieren, Wässern in PBS, Anfärbung mit FITC-anti-IgG. Die Immunfluoreszenz-Beobachtung erfolgte in einem ZEISS-Mikroskop mit Auflichtbeleuchtung; Dokumentation auf KODAK Ektachrome Diafilm (EPD), bei 26° DIN-Einstellung und 23° DIN-Entwicklung.

Histologie: Fixierung in 4 %iger Formalin- oder in Dubosq-Brazil-Lösung. Die Gewebeproben wurden freundlicherweise

am Pathologischen Institut München (Prof. Eder, PD Dr. Pielsticker) und in einer späteren Phase am Pathologischen Institut Mainz (Prof. W. Thoenes, Prof. Dr. Langer) in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Schnitte wurden vorwiegend mit PAS (Periodic Acid Schiff) und auch mit Silber Methenamin angefärbt. Bei der Befundung wirkte anfänglich PD Dr. Pielsticker mit, spätere Präparate vom Pathologischen Institut Mainz wurden als Teil der Dissertation selbst ausgewertet und fotodokumentiert.

5. Nierenfunktionsmessungen

Serumharnstoff nach Berthelot mit Reagenziensatz "Ingotest 553651" der Fa. Boehringer/Ingelh.-Normalwerte bei BN Ratten: bis 50 mg %.

Kreatininbestimmung nach Jaffè (Ingotest 552951) mit Enteiweißung des Serums.-Normalwerte bei BN Ratten: bis 1,2 mg %.

Uringewinnung erfolgte in Stoffwechselkäfigen im Zeitraum von 16 Stunden. Zum Zwecke der Harnkonzentrierung wurde der 16-Std.Urin von Tieren ohne Trinkmöglichkeit gewonnen. Die Bestimmung der Osmolarität erfolgte in einem Mikroosmometer, Fa. Knauer, nach der Methode der Gefrierpunktserniedrigung. - Der Normbereich lag zwischen 1000 und 3000 mosmol/l.

Qualitative Eiweiß- und Glucosebestimmungen im Urin erfolgten mit Hilfe von Combistix^{R}, Fa. BM und Uristix^{R}, Fa. Ames.

Alle ermittelten Funktionsparameter außer der Urinosmolarität wurden durch ein "Lab. Trol^{R}"-Kontrollserum der Fa. Dade auf Messgenauigkeit überprüft.

6. Therapeutica

Als Immunsuppressiva wurden folgende Medikamente in Monotherapie verwendet:
Azathioprin (Imurek^{R}), Fa. Wellcome
Cyclophosphamid (Endoxan^{R}), Fa. Asta
Prednisolon (Solu-Decortin H^{R}), Fa. Merck
Die Dosierung betrug 8 mg pro kg zweitäglich, die Applikation erfolgte intraperitoneal.

III. DIE PATHOGENESE DER TUBULO INTERSTITIELLEN NEPHRITIS (TIN)

A. Induktionsphase (O. - 13. Tag), Morphologie und Immunhistologie

1. Versuchsanordnung: Tabelle III

Nach dem in Tabelle III angegebenen Zeitplan wurden jeweils 2 Tiere am entsprechenden Tag heminephrektomiert und die gegenseitigen Nieren dann mit zeitlicher Versetzung von 3 Tagen entnommen. Dadurch wurde einerseits das verfügbare Tiermaterial besser ausgenutzt, andererseits eine begrenzte Verlaufsbeobachtung am gleichen Tier ermöglicht

Tag O = Inj.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13. Tag	
12 Tiere:	2-	-	-	-	-	-2				
4 mg TBM		2-	-	-	-	-	-2			
+ CFA			2-	-	-	-	-	-2		Gruppe I
+ Pertussis				2-	-	-	-	-	2	
					2-	-	-	-	-	-2
						2-	-	-	-	- - 2
12 Tiere:	2-	-	-	-	-	-2				
4 mg TBM		2-	-	-	-	-	-2			Gruppe II
+ CFA			2-	-	-	-	-	-2		
				2-	-	-	-	-	2	
					2-	-	-	-	-	-2
						2-	-	-	-	- - 2

2. Ergebnisse

Vom äußeren Aspekt zeigten die Tiere beider Gruppen während des gesamten Versuchs keine Veränderungen, die auf eine Erkrankung schließen ließen (Abb. 1)

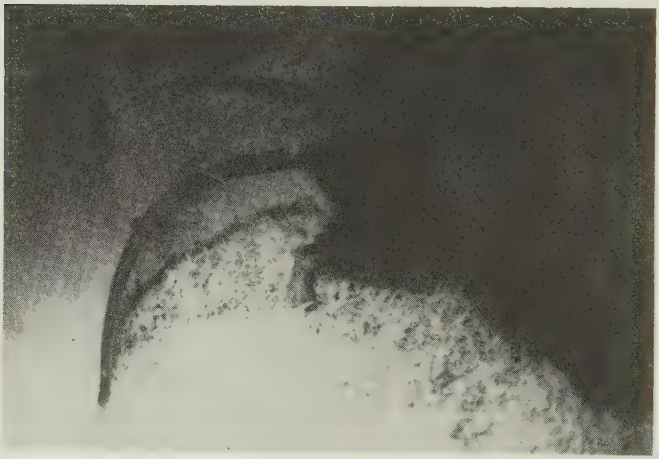


Abb.1: BN Ratte: normales Erscheinungsbild

Die makroskopische Betrachtung der Nieren bis zum 8. Tag nach Immunisierung ergab keine Auffälligkeiten. Am 9. Tag ließ sich bei Gruppe I folgender Befund erheben: Die Nieren wiesen vereinzelt stecknadelkopfgroße, weißliche Herde auf, die sich von der normalen Oberfläche deutlich abhoben. Sie waren leicht vorgebuckelt und hatten eine mittelfeste Konsistenz (Abb. 2, 3). Am 10. und 11. Tag nahmen diese Veränderungen an Größe und Zahl zu und begannen zu konfluieren (Abb. 4, 5, 6). Subcapsulär zeichneten sich dort auch Hämorrhagien ab. An den beiden letzten Tagen des Beobachtungsintervalls (12./13. Tag) schließlich war bei allen Nieren die gesamte Oberfläche blaß und geschwollen. Das ganze Organ besaß eine teigige Konsistenz und war im Vergleich zur Normalniere erheblich vergrößert (Abb. 7). In der Gruppe II begannen die Nierenveränderungen erst einen Tag später, also am 10. Tag nach Immunisierung mit TBM in CFA ohne Pertussiskeime. Der weniger intensiv erscheinende Prozeß behielt bis zum Ende dieses Beobachtungszeitraums einen herdförmigen Charakter.

Histologisch beobachtet man gleichlaufend zu den makroskopischen Befunden bei Gruppe I die frühesten Veränderungen am 9. Tag. In der Übersichtsvergrößerung (Abb. 8) lassen sich unterschiedlich große, fokal verteilte Zellinfiltrate erkennen, die ihre größte Ausdehnung im subcapsulären Rindenbereich haben und sich nach innen keilförmig verschmälern. Unter stärkerer Vergrößerung sieht man, daß die Infiltratzellen zu diesem Zeitpunkt überwiegend segmentkeringe Granulozyten sind. (Abb. 9) Sie liegen im Interstitium und verbreitern dieses erheblich bzw. drängen die Tubuli auseinander. Nur äußerst selten trifft man auch intratubulär Granulozyten an. Die Glomeruli weisen keine Veränderungen auf (Abb. 10). In der weiteren Zeitfolge verlieren die Tubuluszellen ihre Zellgrenzen, werden vakuoli-

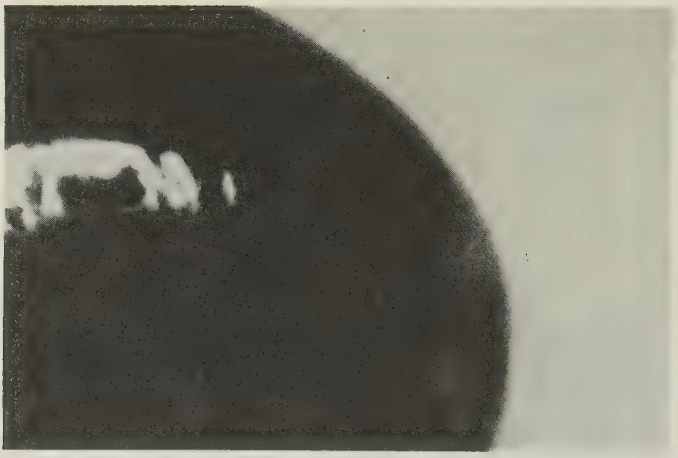


Abb.2: Nierenoberfläche; vereinzelt stecknadelkopfgroße Herde (9.Tag)

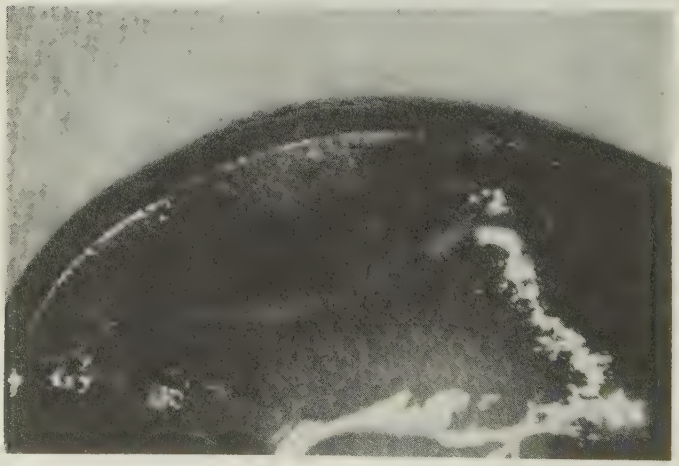


Abb.3: Nierenlängsschnitt: subcapsulärer,weißlicher Herd (9.Tag)

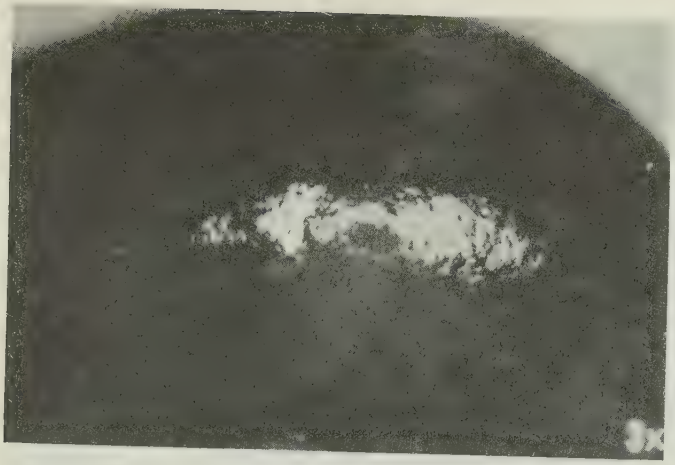


Abb.4: Vergrößerung der Einzelherde am 10./11.Tag

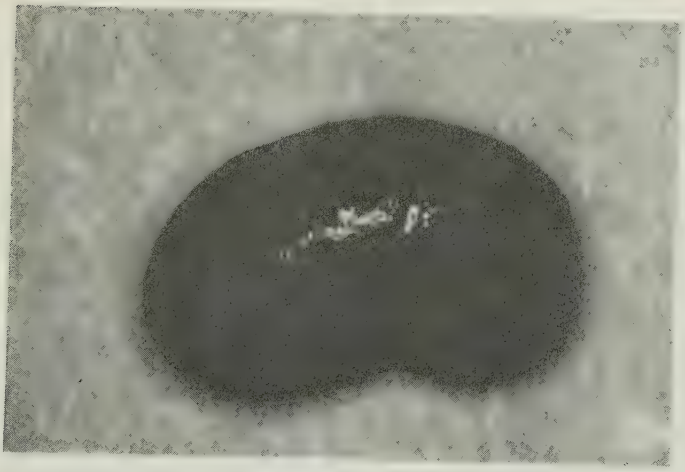


Abb.5: Multiple Infiltrate (10./11.Tag)

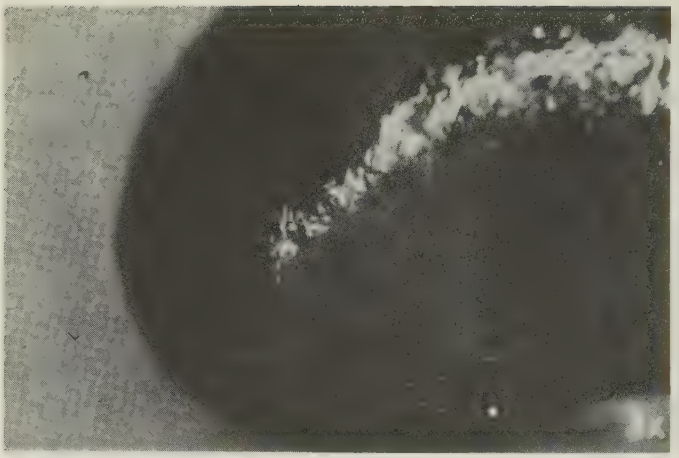


Abb.6: Konfluieren der Infiltate (11.Tag)

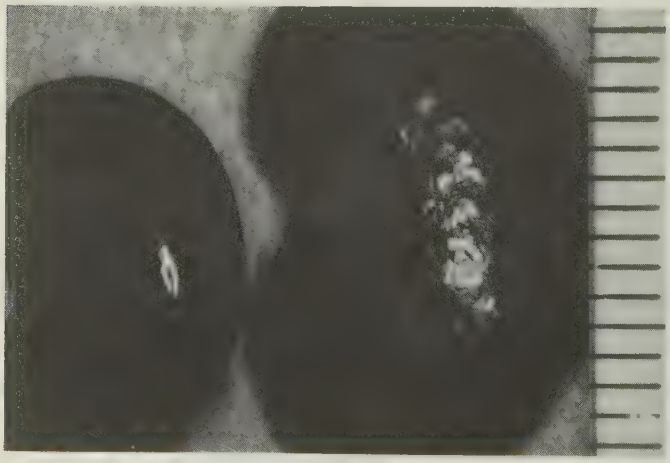


Abb.7: Diffuse Nierenschwellung(13.Tag) im Vergleich zu Normalniere(links) (Maßstab in mm)

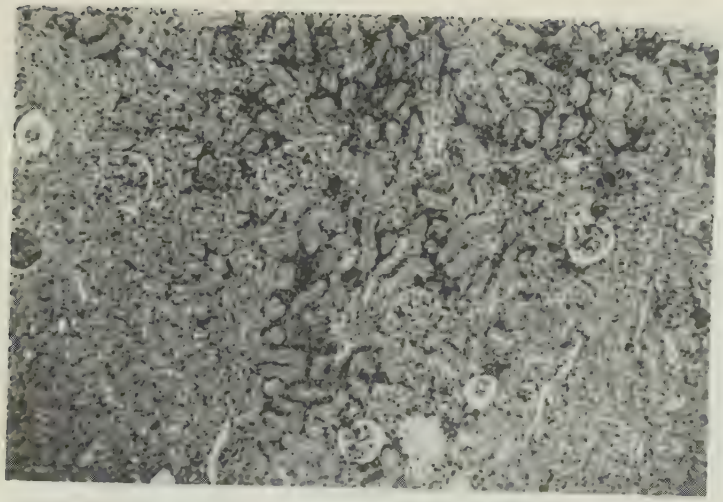


Abb.8: Nierenlängsschnitt: subcapsuläres Zellinfiltrat(Übersicht)
PAS - Färbung

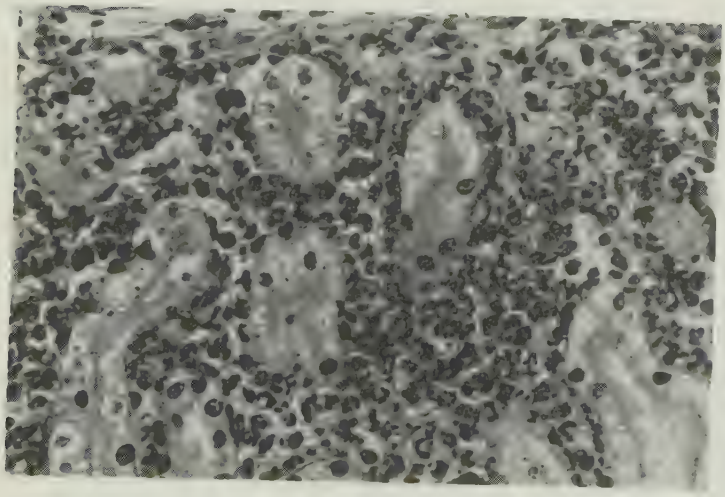


Abb.9: Peritubuläre Granulozyten im Infiltrat
PAS - Färbung

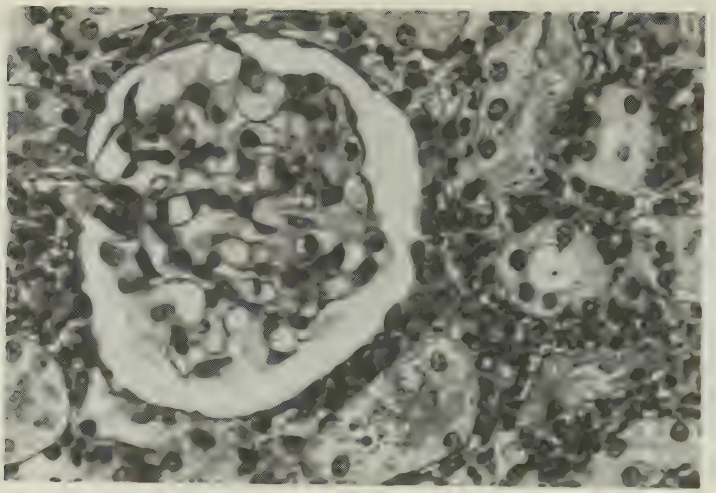


Abb.10: Normaler Glomerulus im Entzündungsareal
PAS - Färbung

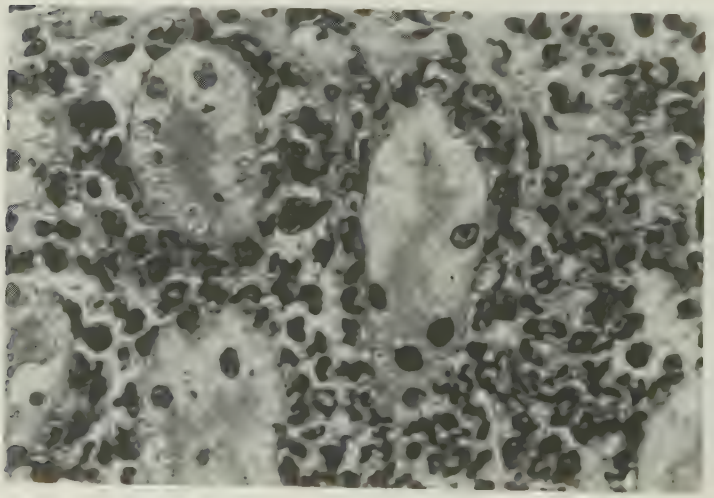


Abb.11: Fortschreitende Tubulus-Zellveränderungen
PAS - Färbung

siert und die Zellkerne pyknotisch (Abb. 11). Mitosen kommen selten vor. Die Atrophie der Tubuli steigert sich im Zentrum der Infiltrate zur Nekrose (Abb. 12); man sieht neben Kernschollen nur noch homogenes, eosinophiles Material. Abgesehen von den Veränderungen des Einzelherdes, konfluieren die einzelnen Infiltrate im Zeitraum von 10 - 13 Tagen und umfassen schließlich mantelartig die ganze Niere bis zu einer Tiefe von zwei Drittel der Rinde. Gleichzeitig aber setzt eine Änderung der Art der Infiltratzellen ein: Man sieht weniger Granulozyten und stattdessen treten mehr Rundzellen auf. Es handelt sich um Lympho- und Histiozyten (Abb. 13).

Die Tubuluszerstörung hat schwere TBM-Deformierungen zur Folge, die in der Versilberung zu erkennen sind: Die TBM ist, im Vergleich zum Normalzustand (Abb. 14) stark geschlängelt und verdickt (Abb. 15), aber auch bei extremen Veränderungen, wie in Abb. 16 gezeigt, bleibt offenbar das Basalmembranmaterial als solches liegen. In der Umgebung solcher zugrundegehender Tubuli finden sich mehrkernige Riesenzellen wie bei Fremdkörper-Reaktionen (Abb. 17). Das gesamte Nierenmark ist am Entzündungsgeschehen nicht beteiligt. Auch die Gefäße zeigen größtenteils keine Veränderungen und nur vereinzelt findet man in der Innenzone der Rinde und dem angrenzenden Markbereich perivasale Lymphozyteninfiltrate (Abb. 18).

Die Beschreibung der histologischen Befunde gilt auch für die Gruppe II (ohne Pertussiskeime), jedoch in zeitlicher Verschiebung mit den ersten Infiltraten am 10. Tag. Die Veränderungen bleiben bis zum 13. Tag herdförmig und auf die äußere Rindenschicht begrenzt. Der Verlauf erscheint weniger foudroyant, z.B. sieht man Tubulusnekrosen seltener.

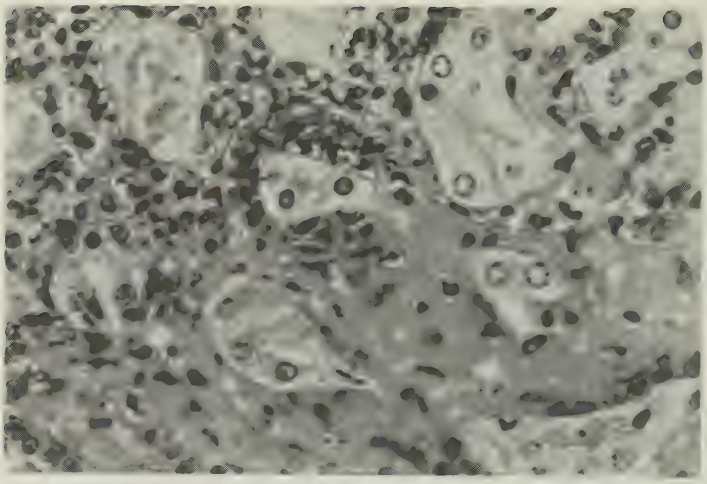


Abb.12: Zentrale Nekrose im Infiltrat
PAS - Färbung

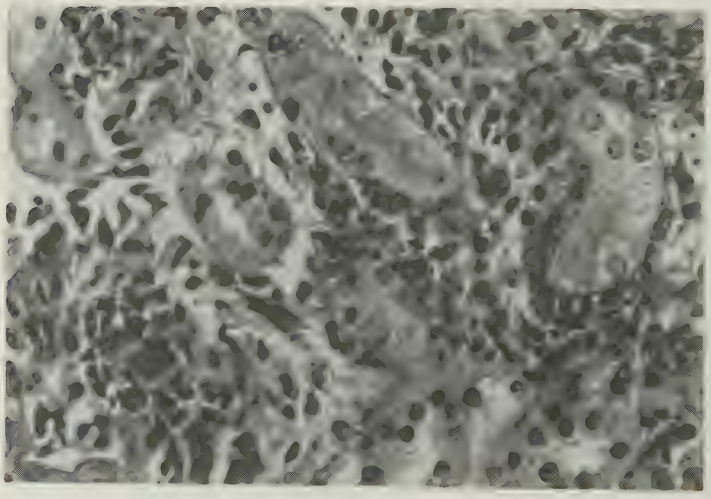


Abb.13: Rundzellinfiltrat (12./13.Tag)

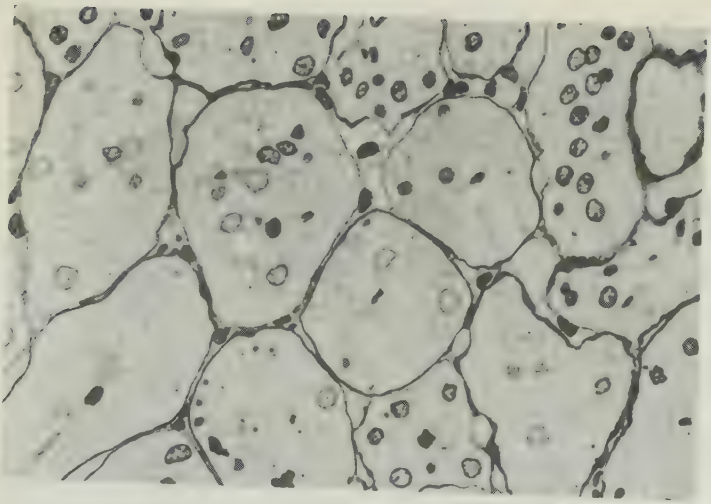


Abb.14: Normale Tubulus-Formation
Silberfärbung

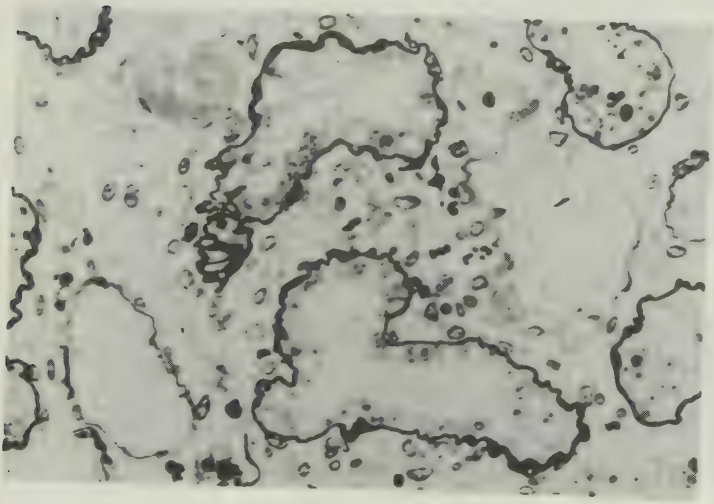


Abb.15: TBM-Deformierung im Entzündungsbereich
Silberfärbung

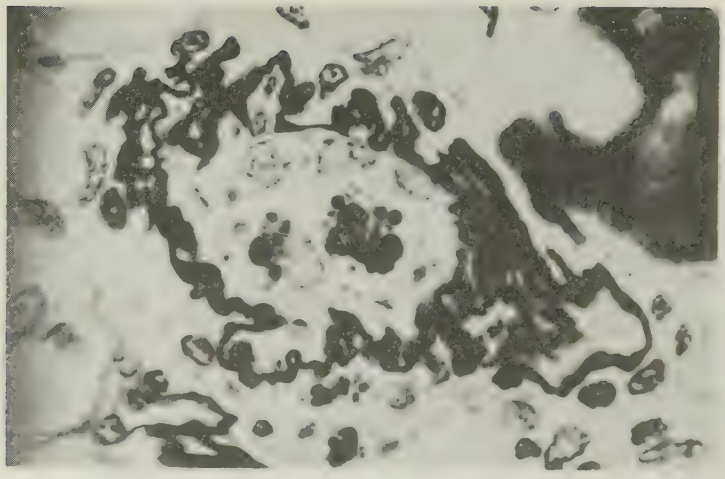


Abb.16: Tubulusdestruktion mit extremen Basalmembranveränderungen
Silberfärbung

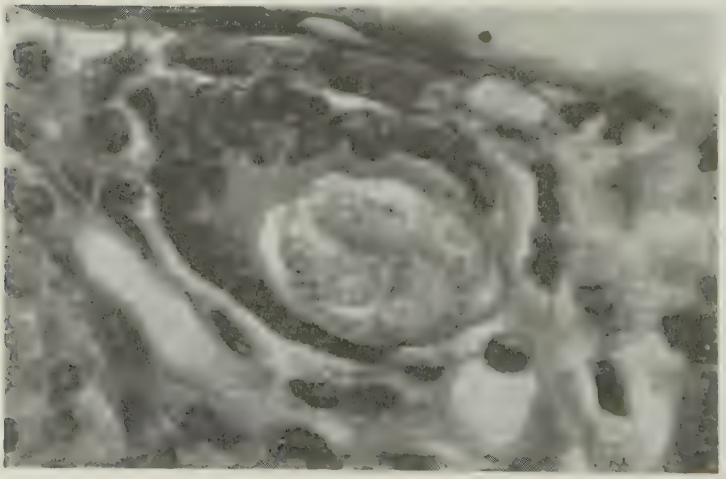


Abb.17: Mehrkernige Riesenzelle
PAS - Färbung

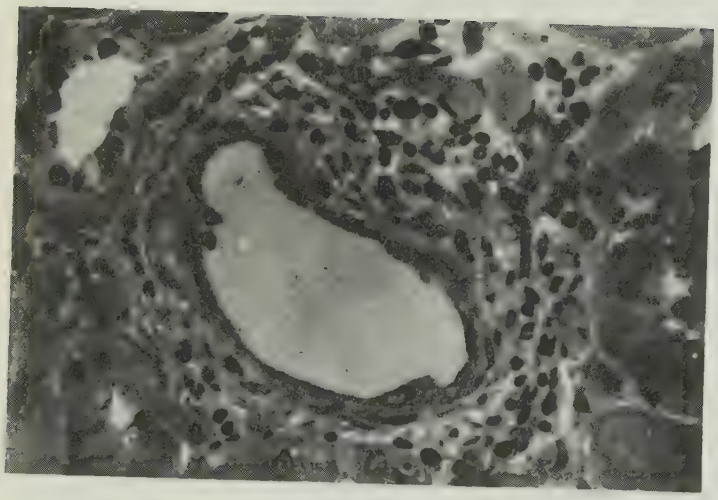


Abb.18: Perivasales Lymphozyteninfiltrat
Giemsa - Färbung

Immunhistologisch sieht man bis zum 6. Tag bei beiden Gruppen keine pathologischen Befunde (anti-IgG, anti-C3). 2 Tage früher als in der Histologie lassen sich in der "Pertussis-Gruppe" am 7. Tag erste Anzeichen einer diffusen und schwach-linearen Akzentuierung der Rinden-TBM und einige Herde mit stärkerer TBM-Fluoreszenz (IgG) beobachten (Abb. 19); diese Herde liegen auffällig perivasal und periglomerulär. Glomeruli und Gefäße selbst, sowie das ganze Nierenmark, sind negativ. Mit anti-C3 kann man zu diesem Zeitpunkt noch keine spezifisch zu wertenden Befunde sehen. Bereits am 8. Tag aber färben sich alle kortikalen Tubulusbasalmembranen diffus und kräftig an, wobei nur noch eine fokale Betonung erkenntlich wird. Ab dem 9. Tag zeigt jede untersuchte Niere eine gleichmäßige, kräftige Fluoreszenz der kortikalen TBM. Das Nierenmark bleibt völlig negativ, was an der scharf gezeichneten Rinden-Markgrenze zu sehen ist (Abb. 20). Auf der anderen Seite sieht man eine scharfe Abgrenzung gegenüber den Glomeruli, deren Basalmembranen sich nicht anfärben (Abb. 21). Auch die Gefäße sind negativ. Im Verlauf der Tage 10 bis 13 kann man parallel zu den morphologischen Veränderungen auch in der Immunfluoreszenz Wandlungen feststellen: In subcapsulären Bereichen der Rinde erscheinen die Tubuli auseinandergedrängt und in ihrer Form verändert (Abb. 22, 23). Die Basalmembrankonturen sind verbreitert, im Verlauf geschlängelt und verschwommen (Abb. 24) oder man erkennt ein Membrankonglomerat, das kaum noch an einen Tubulus erinnert (Abb. 25). Die beschriebenen Veränderungen finden sich wiederum bei Gruppe II, ohne Pertussis-Adjuvans, weniger stark ausgeprägt und auf einzelne Herde begrenzt.

Die obigen immunhistologischen Befunde sind insgesamt am deutlichsten mit anti-IgG dargestellt. Aus bisher nicht

Abb.19:
IgG-Ablagerung an der TBM,herdförmig periglomerulär

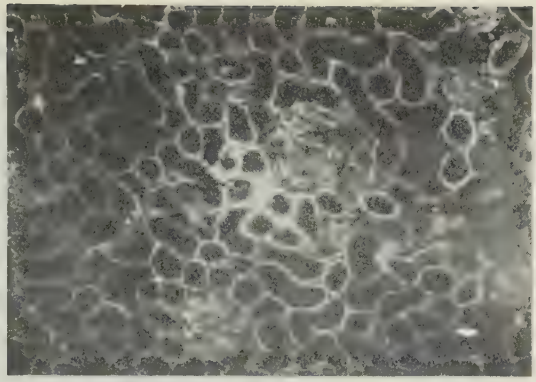


Abb.20:
IgG-positive Rinden-TBM, Mark negativ

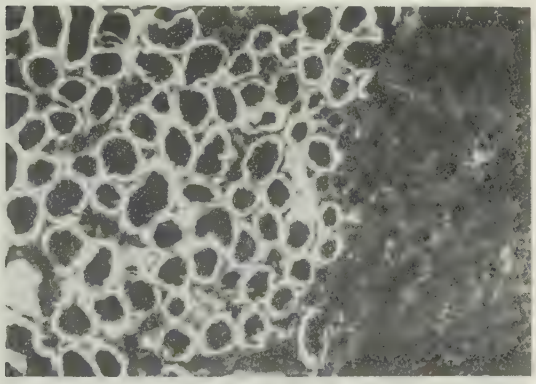


Abb.21:
TBM positiv(IgG) Glomerulus negativ

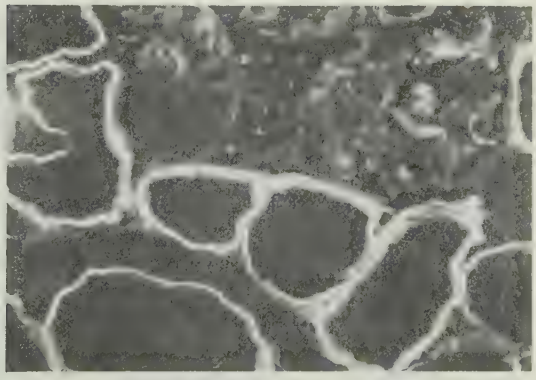


Abb.22:
Geschlängelte TBM
(IgG)

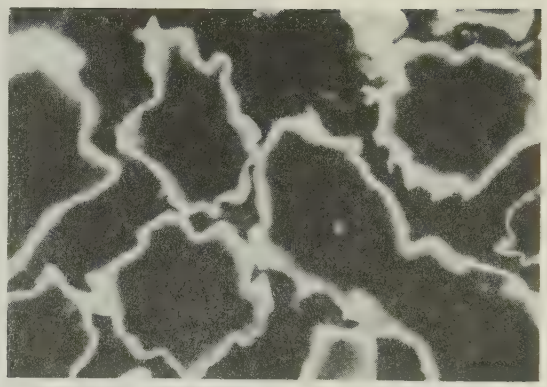


Abb.23:
TBM-Destruktion
(IgG)

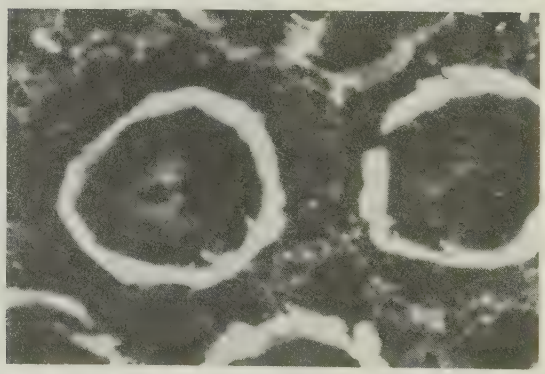


Abb.24:
TBM-Konturen ver-
schwommen
(IgG)

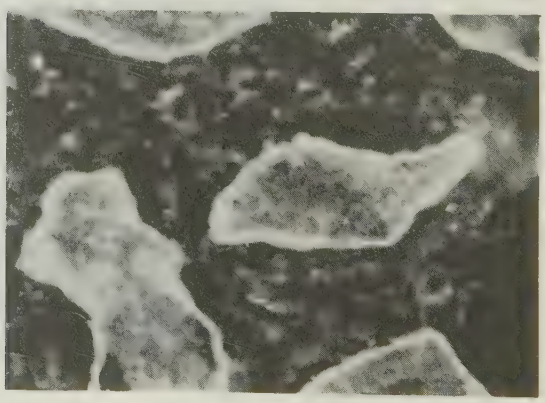


Abb.25:
Membrankonglomerat der Tubuli (IgG)

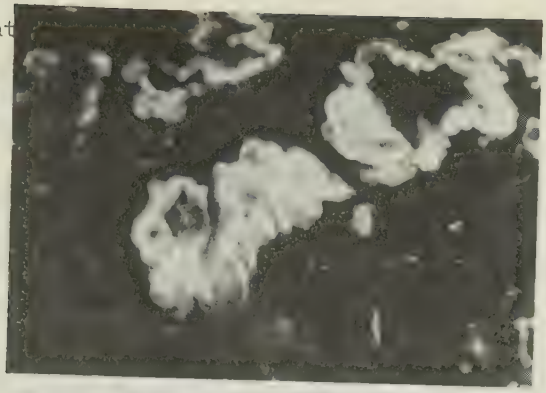


Abb.26:
Normalniere (C3)

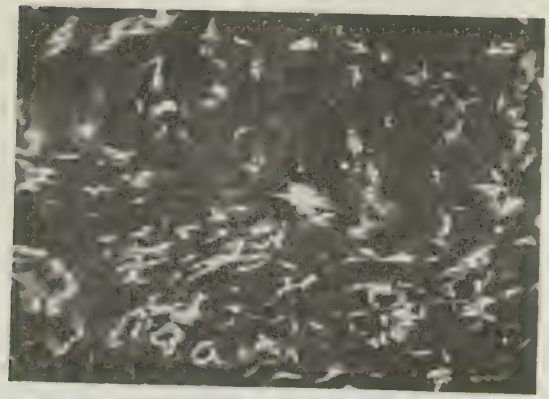
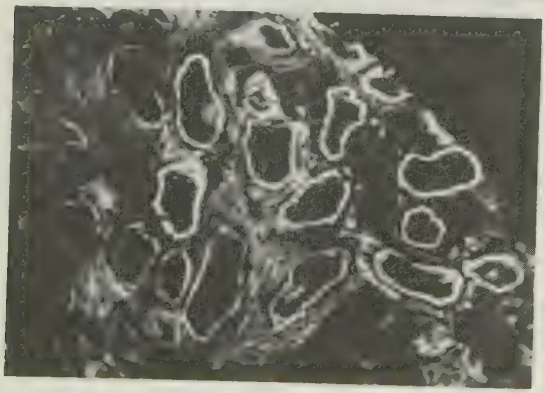


Abb.27:
TBM-Fluoreszenz im Rindenbereich (C3)



geklärten Gründen zeigen Normalnieren mit anti-C3 eine diffus verteilte, partiell lineare Fluoreszenz einzelner Teile der TBM von Rinde und Mark (Abb. 26), die nicht mit der spezifischen C3-Anfärbung verwechselt werden darf. Solche spezifisch zu wertenden Befunde mit C3 sieht man am 9. Tag (Abb. 27). Sie sind bei Gruppe I besonders ausgeprägt und ebenso wie IgG auf die äußere Rindenschicht beschränkt, jedoch immer mehr oder weniger herdförmig.

3. Zusammenfassung

Tabelle IV: Zeitliche Korrelation verschiedener Parameter in der Induktionsphase

		5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.Tag
Immunhistologie	IgG	Ø	Ø	(+)	+	+	+	+	+	+
	C3	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	+	+
Histologie		Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	+	+
Makroskopie		Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	+	+

Auf die Immunisierung folgt eine Latenz-Phase, in der an der Niere keine Befunde festgestellt werden können. Die Ablagerung von IgG erfolgt dann ausschließlich an der Tubulusbasalmembran der Rinde, zunächst fokal-betont und bevorzugt in den äußeren Schichten.

Die IgG-Ablagerung geht der Complementfixierung und den ersten morphologischen Befunden knapp, aber deutlich um einen Tag voraus.

Die histologischen Veränderungen am 9. Tag korrelieren mit dem Zeitpunkt des C3-Nachweises und stellen somit sehr

wahrscheinlich eine klassische Antigen-Antikörper-Complement-vermittelte, akut-entzündliche , granulozytäre Reaktion am Tubulus dar.

Die Adjuvanswirkungen in den beiden Gruppen sind qualitativ identisch, zeitigen aber quantitativ erheblich verschiedene Gewebsläsionen.

B. Restitutionsphase (3. Woche bis 8. Monat), Morphologie, Immunhistologie und Funktion

1. Versuchsanordnung

Für die kontinuierliche Beobachtung über einen längeren Zeitraum wurde wegen der nicht-überschießenden Art der Reaktion das Modell ohne Pertussis-Adjuvans, nur mit CFA, gewählt. Es wurden 2 Gruppen gebildet:
3 Tiere und 1 Kontrolle für den Zeitraum 1. - 4. Woche (Nr. 82 - 85)
9 Tiere und 3 Kontrollen für den Zeitraum 1. - 8. Monat.
Gewebeproben wurden in ca. wöchentlichen Abständen in der ersten Gruppe und 6 Wochen, 4 u. 8 Monate nach Immunisierung in der zweiten Gruppe gewonnen. Blutentnahmen erfolgten bei Gruppe 1 (Tiere Nr. 82 - 85) ebenfalls wöchentlich, bei der anderen Gruppe in 14-tägigen bis monatlichen Abständen. Die Immunisierung wurde nach Standardbedingungen mit 4 mg Schaf-TBM in CFA bei den experimentellen, und mit CFA-Emulsion allein bei den Kontrollen durchgeführt.

2. Ergebnisse

Trotz der gehäuften Operationen boten die Tiere einen gesunden Aspekt. Die Nieren waren makroskopisch wegen der vorangegangenen operativen Eingriffe nicht zu beurteilen. Auffällig war bei Tier Nr. 83 der ersten Gruppe zum Zeitpunkt der 4-Wochen-Nephrektomie linksseitig eine deutliche Stauungsniere, die auf die Manipulationen während der Biopsien zurückzuführen sein dürfte.

Histologisch wurden bei den Tieren der Gruppe bis zu 4 Wochen individuell zum jeweiligen Zeitpunkt folgende Beobachtung gemacht:

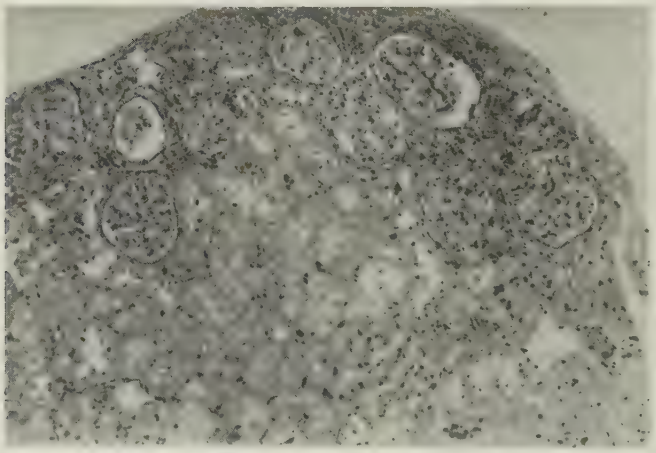


Abb.28: Subcapsulär dichtstehende Glomeruli(4.Wo) PAS - Färbung

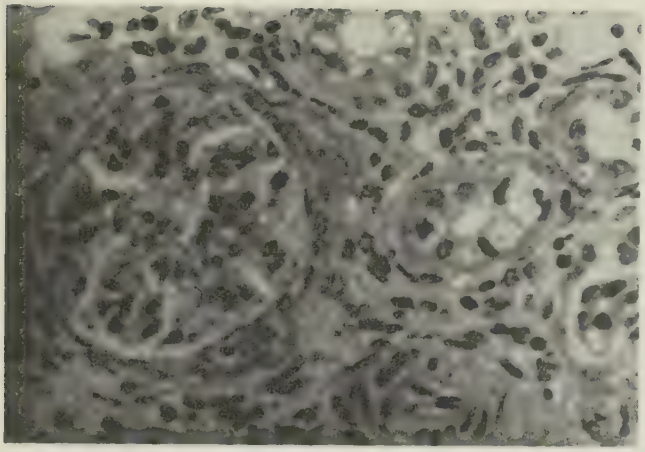


Abb.29: Periglomeruläre Fibrose
PAS - Färbung

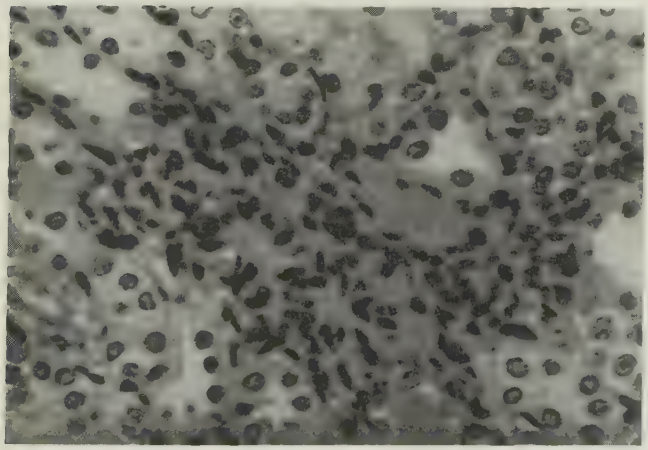


Abb.30: Vermehrung interstitieller Zellen
(Fibroblasten)
PAS - Färbung

Tabelle V: Individuelle histologische Befunde im Zeitraum von 1 - 4 Wochen nach Immunisierung

Tier Nr.	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
82	Ø (=negativ)	(vereinzelt perivenös Rundzellen)	Tubulusatrophie interstit. Lymphozyten, Plasmazellen; keine Granulozyten	dichtstehende Glomeruli, herdförmige periglom. Fibrose, Vermehrung interstit. Zellen: a. Histiozyt. b. Lymphozyt.
83	Ø	subcapsuläre Tubulusnekrosen, interstit. Granulozyten, perivasal Lymphozyten, Fibroblasten mit Mitosen	interstit. Lymphozyten, (Biopsie aus juxtamedullärem Bereich!)	wie 82, aber stärker
84	Ø	wie 83, aber keine Tubulusnekrosen	Tubulusatrophie perivenös Rundzellinfiltrate	wie 82, aber schwächer
85 (Kontrolle)	Ø	Ø	Ø	Ø
		(kein pathologischer Befund)		

Repräsentative Beispiele der histologischen Befunde in der 4. Woche sind in den Abbildungen 28, 29, 30 wiedergegeben.

Die Auswertung des Biopsiematerials wurde durch den herdförmigen Charakter der Erkrankung behindert, d.h. nicht in jeder Biopsie z.B. der 2. Gruppe mit Langzeitbeobachtung,

ließen sich Befunde feststellen. In der Zusammenschau der 9 Tiere mit insgesamt 27 Gewebeproben im Zeitraum von 6 Wochen bis 8 Monaten nach Immunisierung ergab sich jedoch, daß sich histologisch der anfänglich akute granulozytäre Entzündungsprozeß über ein lymphoplasmazelluläres und histiozytäres Stadium in einen narbigen Restzustand mit nur mehr geringer Zellinfiltration zurückbildet.

Zusammengefaßt wurden histologisch zu den späteren Zeitpunkten folgende Beobachtungen gemacht:

Tabelle VI: Zusammenfassung der histologischen Befunde im Zeitraum bis zu 8 Monaten nach Immunisierung

	6 Wochen	4 Monate	8 Monate
Tubuli:	subcapsulär, herdförmige Atrophie	Atrophierestlicher Tubuli im Entzündungsbereich	überwiegend Tubulusschwund im Herd
Interstitium:	subcapsulär, herdförmig Lymphozyten und weniger Plasmazellen	wenig Entzündungszellen, einige Plasmazellen	herdförmige Fibrose, vereinzelt Rundzellen
Glomeruli:	kollabierte Schlingen	im Entzündungsbereich dichtstehend	Kapselfibrose (segmentale Sklerose)
Gefäße	normal	normal (perivenös Plasmazellen)	normal

Repräsentative histologische Befunde zum Zeitpunkt von 4 und 8 Monaten sind in den Abbildungen 31, 32, 33 dargestellt.

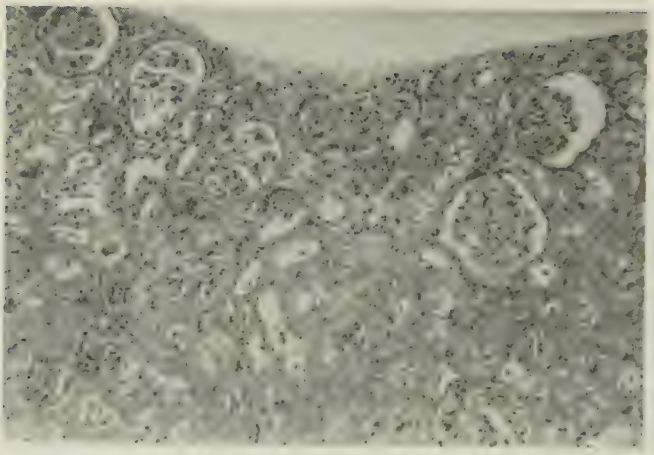


Abb.31: Narbige Einziehung im Infiltratbereich
PAS - Färbung

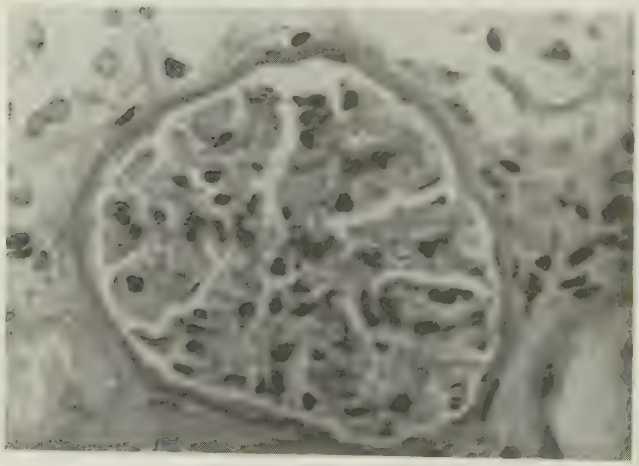


Abb.32: Glomerulus mit Kapselfibrose und
Schlingenkollaps(8.Mo)
PAS - Färbung

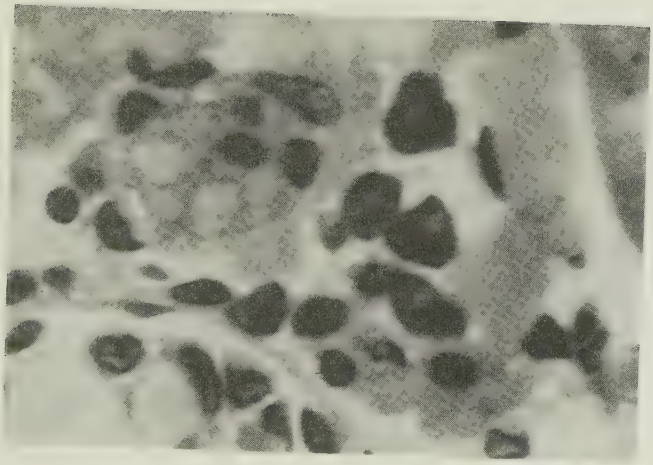


Abb.33: Interstitielle Rundzellen(Plasmazellen, Lymphozyten)
Giemsa - Färbung

Entsprechend der Histologie sind alle Nieren in der 1. Woche immunhistologisch negativ. Die Biopsie der zweiten Woche jedoch zeigt bei allen Versuchstieren eine lineare IgG-Ablagerung an der Rinden-TBM. Zum selben Zeitpunkt sind Complementbefunde im wesentlichen auf kleine, subkapsuläre Herde beschränkt. In der 3. Woche weisen alle Rindentubuli mit Anti-Ratten IgG eine kräftige Anfärbung ihrer TBM auf, wobei die im vorigen Kapitel beschriebenen Veränderungen nachweisbar sind: Schlängelung, variierende Dicke, teilweise Unterbrechung der Membrankontinuität. Die C3-Fluoreszenz ist im Vergleich zur Vorwoche verstärkt, behält aber ihren herdförmigen Charakter. Während die IgG-Befunde der 4. Woche keine Änderungen, bezogen auf die vergangene Woche, bieten, sind die Complementablagerungen quantitativ deutlich schwächer. Die Gewebeproben zum Zeitpunkt 6 Wochen unterscheiden sich immunhistologisch kaum vom Zustand bei 4 Wochen. Mit 4 Monaten allerdings kann man von der subcapsulären TBM nur noch IgG-positive, breite und schüttere Bänder abbilden (Abb. 34).

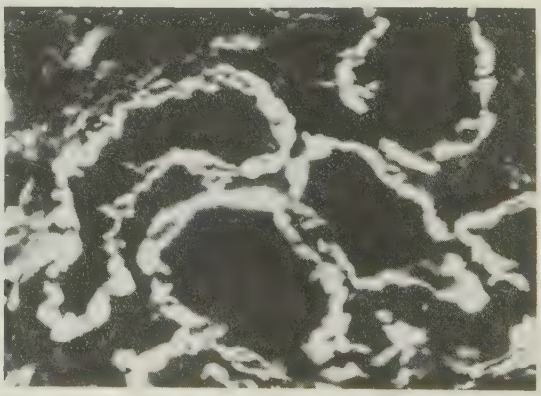


Abb.34:
TBM-Destruktion nach 4 Monaten (IgG)

Dieses Fluoreszenzmuster findet man auch zum Zeitpunkt 8 Monate. Glomeruli und Gefäße bleiben über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg negativ.

Die Präparate aller Kontrolltiere sind sowohl histologisch wie immunhistologisch immer negativ.

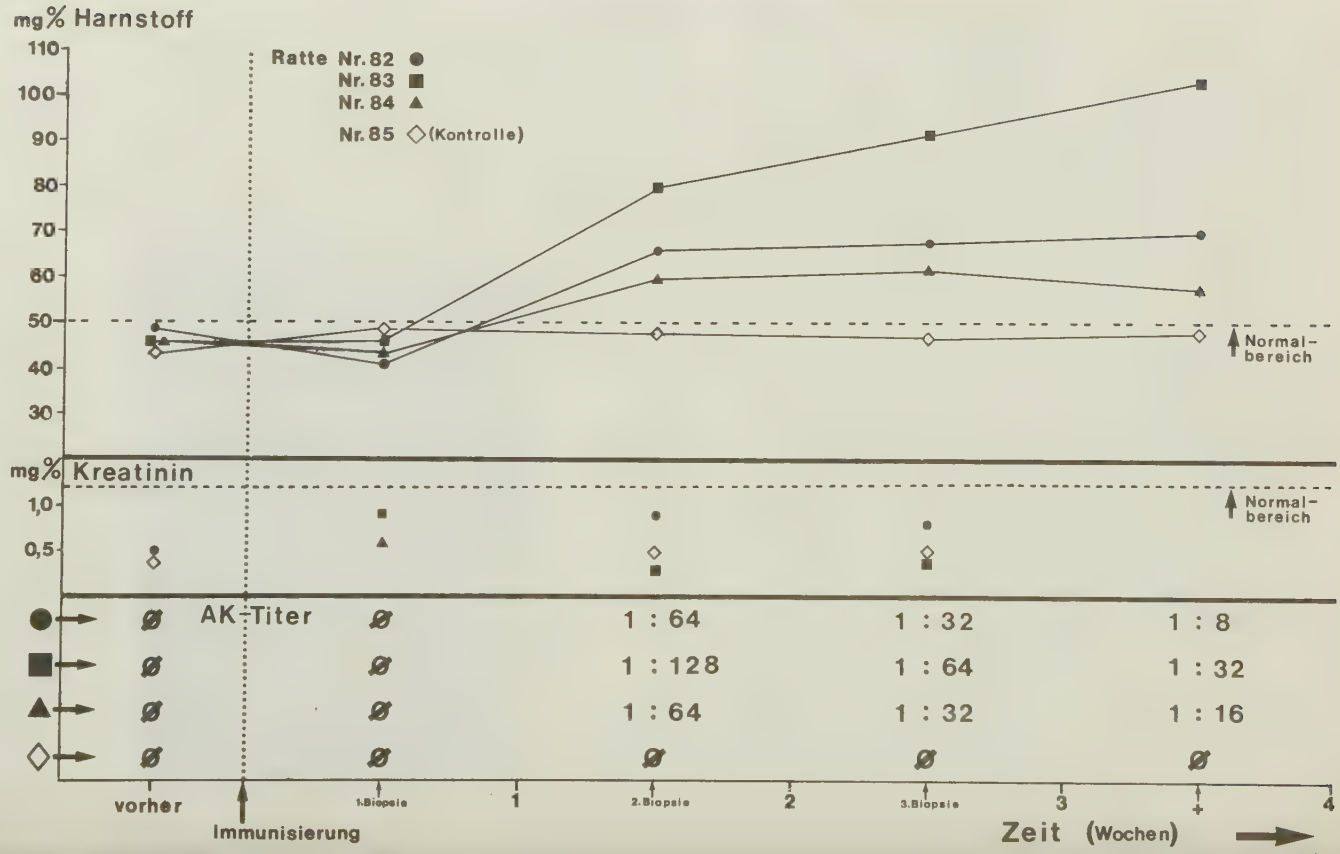
Die Untersuchung der Serumproben auf TBM-Antikörper, Serumkreatinin und -Harnstoff ergab die folgenden Befunde (Text-Fig. 1 und 2):
Die TBM-Antikörper wurden in der 2. Woche nachweisbar, wobei ein Titer bis zu 1 : 128 gemessen wurde. Es ist bemerkenswert, wie schnell in den beiden nächsten Wochen die Titer abfallen, was den für eine Autoimmunreaktion ungewöhnlich akuten Ablauf der Pathogenese unterstreicht. Auch später im Verlauf finden sich nur noch geringe TBM-Antikörper-Titer.

Der Serumharnstoff ist der einzige klinisch-chemische Parameter, der von uns im Gesamtverlauf der tubulo-interstitiellen Nephritis pathologisch gefunden wurde. Dies beginnt in der 2. Woche mit Erhöhungen, die deutlich über dem Normalniveau liegen, aber unterschiedlich je nach Grad der Affektion bzw. der Antikörperspiegel sind (s. Text-Fig. 2, Tier Nr. 83). Das Serumkreatinin, das stichprobenartig bestimmt wurde, blieb im Normbereich und reflektiert damit die fehlende glomeruläre Affektion. Die tubulointerstitielle Schädigung ist dagegen, trotz der fokalen Verteilung, funktionell erheblich wirksam, so daß auch nach 4 und 8 Monaten ein signifikant erhöhter Harnstoffspiegel verbleibt (Text-Fig. 2). Die Versuche, durch Messung der Urinosmolarität, des Urinvolumens, des Urineiweiß oder -zuckers weitere Parameter der Funktionsstörung zu erhalten, waren ohne Erfolg, da alle Werte nicht von denen der

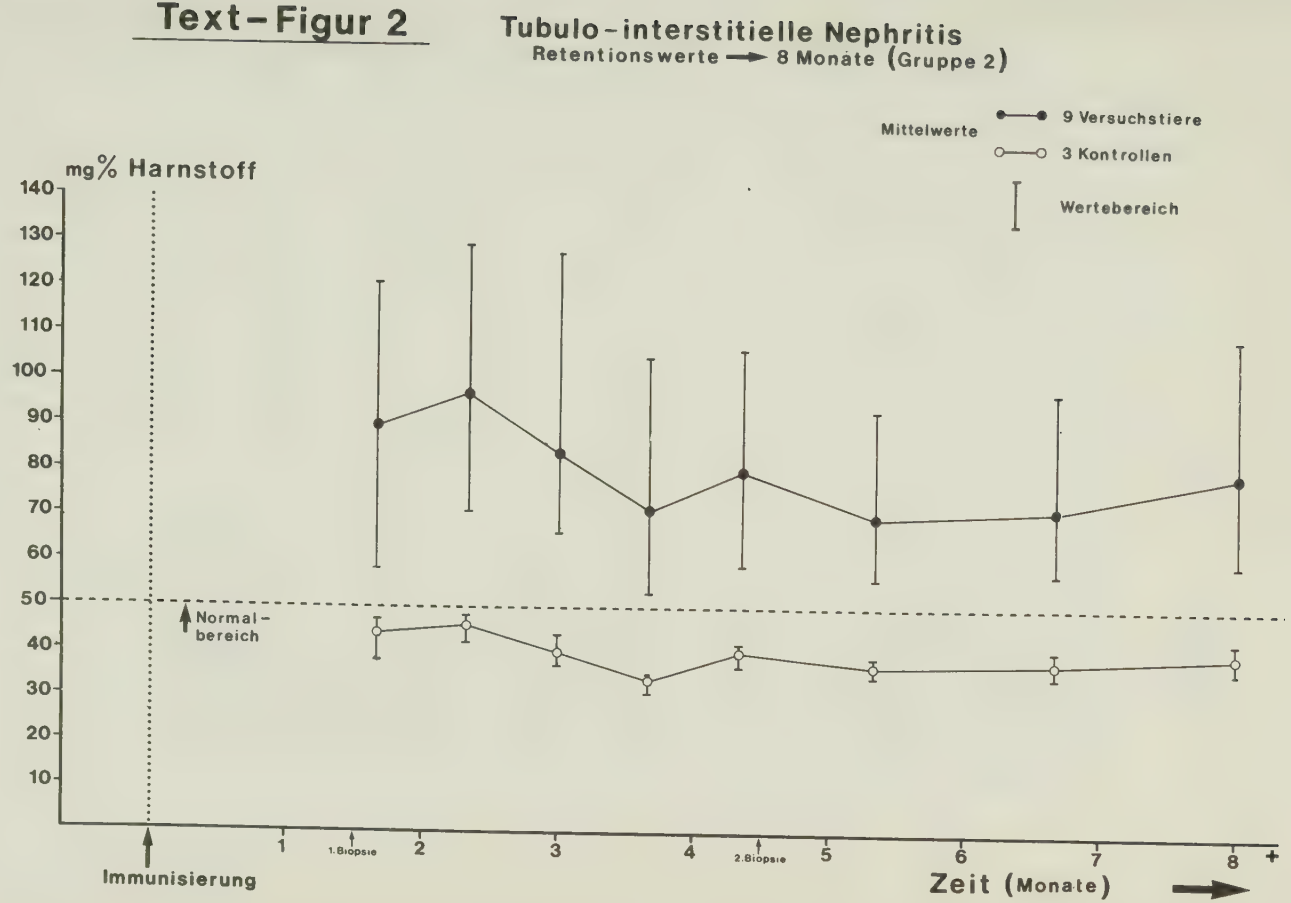
Text-Figur 1

Tubulo-interstitielle Nephritis

Verlaufsbeobachtung → 4 Wochen (Gruppe 1)



Text-Figur 2


Tubulo-interstitielle Nephritis
Retentionswerte → 8 Monate (Gruppe 2)
Mittelwerte
9 Versuchstiere
3 Kontrollen
Wertebereich
mg% Harnstoff
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
Normal-bereich
Immunisierung
1
1. Biopsie
2
3
4
2. Biopsie
5
6
7
8
+
Zeit (Monate)

Kontrolltiere abwichen; sie sind deshalb hier nicht dargestellt worden.

3. Zusammenfassung

Eine tubulo-interstitielle Nephritis, die unter abgeschwächten CFA-Bedingungen entsteht, zeigt im Zeitraum zwischen 3 Wochen und 8 Monaten nach Injektion ein Abklingen der akut-entzündlichen Erscheinungen mit narbiger Umwandlung der befallenen Bereiche. Regenerationsversuche tubulärer Zellen im Sinne einer restitutio ad integrum sind nicht zu beobachten. Es ist bisher ungeklärt, ob verbleibende lympho-plasmazelluläre Infiltrate als Ausdruck fortwirkender chronischer, zellulär-immunologischer Prozesse zu betrachten sind.

Basalmembran-fixiertes IgG ist auch nach 4 Wochen noch festzustellen. Membranfixiertes C3 ist demgegenüber deutlich vermindert. Nach 4 und 8 Monaten zeigen sich die tubulären Basalmembranen als IgG-positive, aber hochgradig deformierte Strukturen.

Der Grad der Nierenschädigung wird offensichtlich von der Intensität der Antikörperantwort bestimmt. Die gering bis mittelgradig erhöhten Harnstoffwerte sind typisch für den Gesamtverlauf bleiben bis zum 8. Monat pathologisch. Der histologisch fokale Schaden, im Spätstadium als Narben erkenntlich, ist offenbar so weitgehend, daß die Gesamtfunktion der Niere bei der Harnstoff-Elimination gestört ist. Andere klinisch-chemische Maßstäbe zeigten keine Abweichung von der Norm.

C. Untersuchungen zur Spezifität der TBM-Antikörper

1. Spezifität für Schafnieren

Serum von immunisierten Ratten wurde mit Gefrierschnitten von Schafnieren inkubiert und diese mit indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Alle tubulären, aber auch die glomerulären Basalmembranen vom Schaf zeigten lineare Fluoreszenz. Das Rattenserum enthält also Antikörper, die gegenüber dem heterologen Nierengewebe nicht zwischen den verschiedenen Basalmembranantigenen unterscheiden, d.h. es müssen übergeordnete, speziesabhängige antigene Determinanten der Basalmembranen vorliegen.

2. Spezifität der Rattennieren-fixierten Antikörper

2 Wochen nach Immunisierung der Tiere wurden Rattennieren homogenisiert und einer sauren Elution unterzogen. Der nach Neutralisation gewonnene Überstand wurde nach Ankonzentrierung des eluierten Proteins auf BN-Nieren-Gefrierschnitte überschichtet und mit der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Alle tubulären Basalmembranen der Rinde zeigten danach eine zarte, aber eindeutige lineare Fluoreszenz, während die Glomeruli negativ sind. Daraus ist zu schließen, daß der in-vivo fixierte Antikörper tubulus-spezifisch ist.

3. Spezifität der Complementfixierung an der TBM

Während in der Immunhistologie die IgG-Befunde der befallenen Nieren sich immer eindeutig von den völlig negativen Kontroll- oder Normalnieren unterscheiden, ist die

C3-Fixierung nicht so eindeutig zu werten. An allen Nieren, ob gesund oder erkrankt, läßt sich immer ein gewisses Maß an C3-Fluoreszenz finden (Vergleiche Abb. 26). Um diese "artefizielle C3-Fixierung" besser beurteilen zu können, wurden folgende Untersuchungen gemacht:
a) Um eine unspezifische Bindung des FITC-Kaninchen-anti-Ratten C3 an Nierenstrukturen der Ratte zu erforschen, wurden normale Rattennieren homogenisiert und zusammen mit dem konjugierten Antiserum inkubiert. Der nach Zentrifugation wieder ankonzentrierte Überstand wurde auf Gefrierschnitte von normalem wie pathologischem Rattennierengewebe verbracht und, im Vergleich mit normalem FITC Kaninchen-anti-Ratten C3, untersucht. Dabei ergab sich qualitativ kein Unterschied in der Fluoreszenz.
b) Das fluoreszenzmarkierte Antiserum gegen C3 wurde mit Ratten-C3-Zymosan-Komplex inkubiert, um es spezifisch zu absorbieren. Der Überstand des zentrifugierten Inkubats wurde, wie oben beschrieben, getestet und wiederum mit unabsorbiertem Antiserum verglichen. Das Ergebnis war ein Verschwinden jeglicher Fluoreszenz durch die Absorption. Auch in der Immunelektrophorese des Inkubats läßt sich gegen Rattenvollserum keine C3-Bande mehr nachweisen.
c) Eine weitere Testung von normalem FITC Kaninchen-anti-Ratten C3 an Nierengewebe anderer Spezies (Mensch, Kaninchen), ergibt keinen positiven Befund.

Aus den Complementuntersuchungen resultiert, daß jede beobachtete C3-Fluoreszenz an Gefrierschnitten von Rattennieren für diesen Complementfaktor spezifisch ist. Der Befund von C3 an Tubulusbasalmembranen normaler Rattennieren bleibt unerklärt.

4. Übertragbarkeit der Serumantikörper gegen TBM

Als Serumspender wurden BN Ratten mit 4 mg Schaf-TBM + CFA + Pertussiskeimen immunisiert. 12 Tage danach Entblutung aller Tiere durch Aortenpunktion und Poolen des gewonnenen Serums. Die zur gleichen Zeit entnommenen Nieren wurden auf positive TBM immunhistologisch geprüft. Serum von Normaltieren diente als Kontrolle. Die Transfer-Versuche wurden in 3 Gruppen vorgenommen:
Gruppe I: An 5 aufeinanderfolgenden Tagen täglich 2 ml des Poolserums pro Tier (4 Tiere), bzw. 2 ml Normalserum (2 Tiere); Applikation intraperitoneal.
Gruppe II: Injektion von 1 ml Poolserum intraarteriell (A. renalis) und intravenös (je 2 Tiere)
Gruppe III: Knapp 2 Monate alte, weibliche (kleine) Tiere wurden heminephrektomiert. An 4 aufeinander folgenden Tagen intravenöse Injektion von je 2 ml Poolserum (3 Tiere), bzw. Normalserum (1 Tier).

In allen 3 Gruppen waren mit Hilfe der Immunhistologie eindeutige Befunde zu erheben: Alle Antikörper-Empfänger zeigten mit anti-IgG eine diffuse, lineare Fluoreszenz der corticalen TBM. Diese war bei der Erstbiopsie deutlich kräftiger als nach 2 Monaten. Der Transfereffekt ist in Gruppe III (nach Nephrektomie) stark nachweisbar, bei den Tieren mit intraarterieller Antikörperzufuhr nur schwach. Diese Befunde deuten klar die Dosisabhängigkeit an. Alle Empfänger von Normalserum waren eindeutig negativ. Makroskopisch und histologisch waren keine signifikanten Veränderungen festzustellen: Zwar sieht man gelegentlich bei Antikörper-Empfängern geringe periglomeruläre und perivasale Rundzellen; ihre spezifische Bedeutung ist angesichts der relativ kleinen Zahl von Kontrolltieren und im Hinblick

auf die massiven Befunde bei direkt immunisierten Tieren nicht sicher einzuschätzen. Die vor und nach Serumtransfer durchgeführten Funktionsanalysen ergaben keine vom Normbereich abweichenden Werte.

IV. ASPEKTE DER GENETISCHEN DISPOSITION ZUR TIN-ERKRANKUNG

1. Versuchsbegründung

Die Empfänglichkeit für eine experimentelle, autoimmune Glomerulusbasalmembran-Nephritis ist deutlich speziesabhängig, wobei Schafe als hochempfindlich, Ratten als wenig empfindlich gefunden wurden (53). Innerhalb der Spezies Ratte wurde darüberhinaus eine Disposition bestimmter Stämme für die Quecksilberchlorid-induzierte anti-GBM-Nephritis beobachtet (9). Bezogen auf die Tubulusbasalmembran-induzierte Nephritis (TIN) bei Ratten zeigte sich in Vorversuchen der Stamm BN als besonders disponiert, andere Stämme dagegen schienen resistent. Da beim Menschen eine Häufung bestimmter Erkrankungen in Abhängigkeit von bestimmten Histokompatibilitäts-Genen bekannt ist (z.B. HL-A 27 bei M. Bechterew (5, 56)),andererseits auch bei der Ratte derartige genetische Assoziationen beschrieben wurden, (Experimentelle Allergische Encephalomyelitis (12, 13), Autoimmune Immunkomplex-Nephritis HEYMANN (57, 58)), lag es nahe, die Induzierbarkeit der TIN auf genetische Assoziation zu prüfen. Die Grundlage dafür sind die nach Histokompatibilitätsmerkmalen (MHS) definierten, ingezüchteten Rattenstämme. Begrenzte Voruntersuchungen zu diesem Punkt liegen von Lehman et al. (28) bei der Ratte und beim Meerschweinchen von Hyman et al. (20, 21) vor. Wir möchten hier eine vollständige genetische Analyse der Verhältnisse vorlegen. Die Zuordnung der Tiere zu den RT 1-Haplotypen ist bei den definierten Inzuchtstämmen (Parentaltiere), bei F_1-Hybriden und bei Hybriden von RT1-identischen Stämmen vorgegeben. Die Segregation der Merkmale bei F_2-Hybriden und Backcross-Populationen wurde durch serologische Typisierung der individuellen Tiere festgestellt. Bei der Analyse der Nephritisinzidenz ist in enger Kopplung an das

RT 1-System entsprechend den Mendel'schen Gesetzen bei F_2-Tieren eine Häufigkeitsverteilung von 25 : 50 : 25 und bei Backcrosstieren von 50 : 50 zu erwarten.

Die verwendeten Stämme und ihre Zuordnung zu den jeweiligen Haplotypen ist in Tabelle II (Kap. II) zu ersehen.

Bei der Untersuchung der genetischen Zusammenhänge gingen wir von der Voraussetzung aus, daß die Erkrankungsbereitschaft von 2 Faktoren bestimmt werden könnte:
1. Genetisch-determinierte Bereitschaft zur Immunantwort
2. Genetisch-determinierte Verfügbarkeit des Ziel-Antigens.
Unter diesen Gesichtspunkten wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:
A. Stamm-Abhängigkeit und Segregation der Krankheitsinzidenz: Immunisierung von Parentalgeneration, F_1-, F_2- und Backcrosstieren unter Standardbedingungen (ohne Pertussis-Adjuvans.) Untersuchung der Immunhistologie, Histologie und Serumharnstoffwerte. Adjuvans-Kontrollen.

B. Verfügbarkeit des TBM-Antigens in verschiedenen Stämmen und deren Segregation: Serologische Bestimmung des TBM-Antigens mittels antikörperhaltigem Testserum und durch indirekte Immunfluoreszenz an Nierenschnitten von Parentaltieren und F_2-Tieren.

C. Kompetenz zur TBM-Antikörper-Bildung bei verschiedenen Stämmen: Immunisierung unter Standardbedingungen. Untersuchung der Seren mit indirekter Immunfluoreszenz an TBM-positiven Nierenschnitten (BN).

2. Ergebnisse

A. Stamm-Abhängigkeit und Segregation der Krankheitsinzidenz

Die immunhistologischen Befunde (positive oder negative

Tubulusbasalmembranen) bei den immunisierten Stämmen und den zugehörigen Hybriden sind in der folgenden Tabelle (Tab. VII) dargestellt. Dabei soll schon hier darauf verwiesen werden, daß positive tubuläre Basalmembranen nicht gleichzusetzen sind mit Krankheitsinzidenz, wie weiter unten zu sehen sein wird.

Tabelle VII: Ergebnisse der Immunhistologie bei verschiedenen Inzuchtratten und Hybriden

	Haplotyp		Stamm	Versuchst.	Kontrollen
Parentaltiere: (homozygot)	l		Lewis	0/7 ⁎)	0/3
		(P)	Lewis	0/7	0/2
	n		BN	7/7	0/3
		(P)	BN	10/10	0/3
			LEW.1N	0/8	0/2
	d		BDV	7/7	0/3
			LEW.1D	0/6	0/3
	a		AVN	8/8	0/2
			DA	4/4	0/2
F_1 - Tiere:	l/n		(LEW x BN)	4/4	0/1
	n/n	(P)	(LEW.1N x BN)	7/7	0/2
F_2 - Tiere:	n/n	(P)	(LEW.1N x BN)	23/31	--
	d/d	(P)	(LEW.1D x BDV)	34/44	--
	l/l			4/8	--
	l/n		(LEW x BN)	7/7	--
	n/n			2/2	--
Backcross-tiere:	l/l		(LEW x BN)F_1 x LEW	1/3	--
	l/n			5/7	--
	l/n		(LEW x BN)F_1 x BN	4/4	--
	n/n			7/7	

(P) = zusätzlich mit Pertussiskeimen als Adjuvans immunisiert

⁎) = Anzahl der positiven Tiere im Vergleich zur jeweiligen Gesamtzahl der Tiere.

Abb. 35 ist repräsentativ für die Tiere mit negativen TBM der Tabelle VII. Alle Ratten mit positiven TBM, z.B. vom Stamm AVN (Abb. 36) zeigen die typische Ausdehnung der linearen TBM-Fluoreszenz, wie sie bisher für BN-Ratten zuvor beschrieben wurde. Quantitativ wurden jedoch von Stamm zu Stamm Unterschiede in der Fluoreszenz festgestellt.

Innerhalb einer Gruppe von Parentaltieren wurden uniforme Befunde beobachtet: Alle Tiere sind entweder positiv oder negativ. Es ist jedoch ganz klar ersichtlich, daß sich die Krankheitsinzidenz nicht nach dem RT 1 Haplotyp richtet (vgl. BN gegenüber LEW.1N oder BDV gegenüber LEW.1D). Ferner wird deutlich, daß jene Stämme, die einen Lewis-Background haben, immunologisch negativ sind (vgl. LEW.1N und LEW.1D gegenüber AVN und DA). Wenn man diese Befunde tabellarisch zusammenfaßt, ergibt sich das folgende Bild (Tab. VIII):

Tabelle VIII: Stämme mit und ohne Disposition für tubulointerstitielle Nephritis

Haplotyp	TIN-pos.*)	Tin-neg.*)
a	AVN, DA	-
d	BDV	LEW.1D
l	-	Lewis
n	BN	LEW.1N

*) TIN-positiv/negativ ist hier im Sinne von in vivo-Bindung des TBM-Antikörpers verstanden.

In der Gruppe der F_1-Hybriden wurden auf Grund dieser Erkenntnisse erstens RT 1 - differente, TIN-positive und

Abb.35:
Negative Rinden-TBM
(IgG)

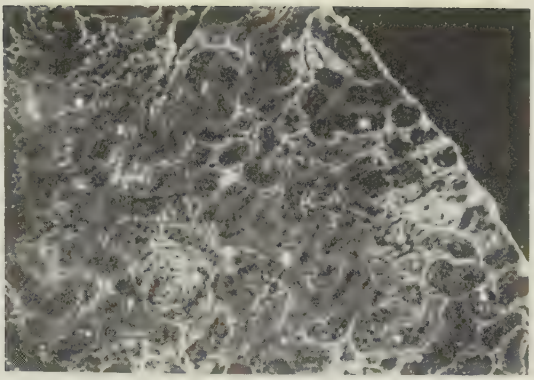


Abb.36:
Positive Rinden-TBM
(IgG)

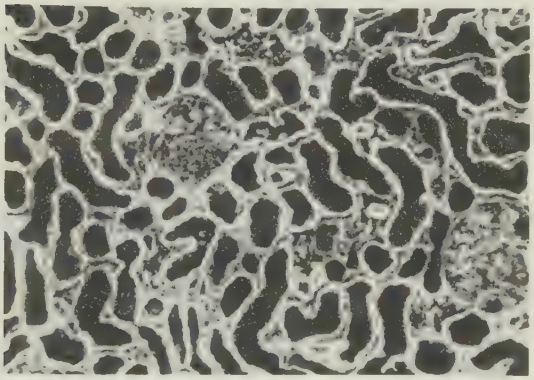
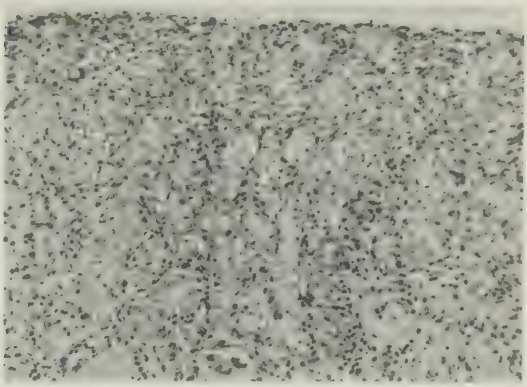


Abb.37:
Zelluläre Infiltration im Rindenbereich(3 Wo)
PAS - Färbung



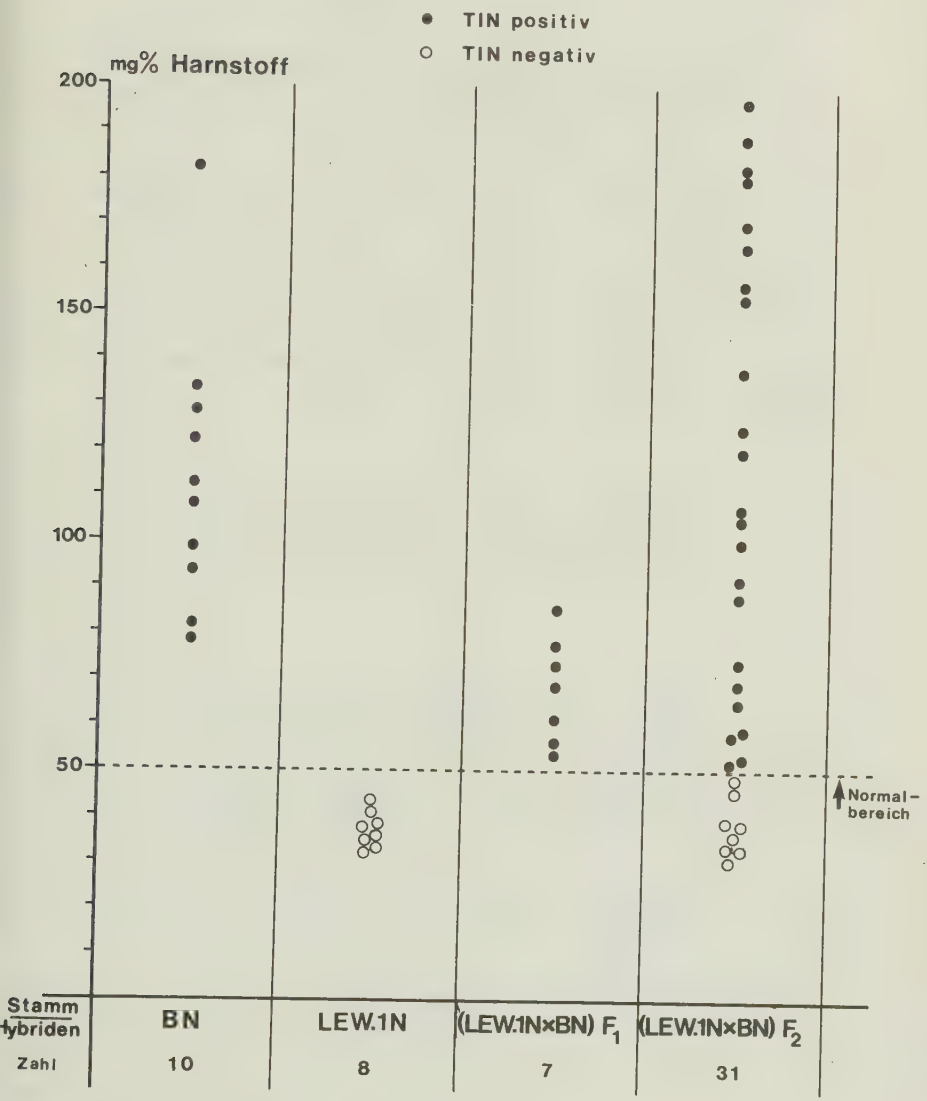
-negative und zweitens RT 1 - identische, Tin-positive und -negative Stämme verpaart. Alle Hybriden erwiesen sich erwartungsgemäß, entsprechend den Mendelschen Regeln, als empfänglich. Bei den F_2-Hybriden und Rückkreuztieren zeigte sich eine deutliche Segregation der TIN-positiven von TIN-negativen Tieren. Da es sich teilweise um F_2-Tiere von RT 1 -identischen Stämmen handelt, ist damit bestätigt, daß die tubulo-interstitielle Nephritis nicht an den RT 1 - Haplotyp gekoppelt ist. Bei Rückkreuzungen auf den empfänglichen Stamm BN dominiert das Gen für Susceptibilität in 100 % der Fälle.

Die bei jedem Parentalstamm und den F_1-Tieren mitimmunisierten Adjuvanskontrollen waren ausnahmslos negativ.

Wenn man weitere Parameter, wie Histologie und Serumharnstoff, als Maßstab für die Krankheitsinzidenz einer TIN heranzieht, so zeigt sich, daß dem immunhistologisch positiven Befund nicht immer eine morphologisch-klinisch manifeste Erkrankung korreliert. Zwar waren alle immunhistologisch negativen Stämme auch bezüglich der übrigen Nierenbefunde unauffällig, aber unter den TBM-positiven Stämmen fanden sich einige, die nach Maßstäben, die im vorigen Kapitel an BN-Ratten erarbeitet wurden, weder signifikante histologische Ergebnisse noch abnorme Harnstoffwerte zeigten. Hierzu gehören die Stämme BDV, DA, die F_1-Tiere (LEW x BN) mit den daraus hervorgehenden F_2- und Backcrosstieren, sowie die (LEW.1D x BDV)F_2-Ratten. Eine mittlere Stellung bezüglich der klinisch und morphologisch manifest werdenden TIN nimmt der Stamm AVN ein, bei dem alle Tiere immunhistologisch positiv waren (Abb. 36), aber nur die Hälfte pathohistologische Erscheinungen zeigten (Abb. 37), die auch zu erhöhten Harnstoffwerten führten. Bei dem Stamm BN und den zugehörigen Hybriden ist die Korrelation

Text-Figur 3

Harnstoffwerte im Serum nach Immunisierung für eine tubulo-interstitielle Nephritis bei BN- und LEW.1N-Ratten, sowie deren F_1- und F_2-Hybriden. Tiere, die im Normalbereich liegen, sind histologisch und immunhistologisch ebenfalls negativ.



positive Immunhistologie - positive Histologie - Nierenfunktionseinschränkung voll gegeben. Text-Figur 3 zeigt, wie sich die Segregation der TIN-Disposition auch funktionell in den Harnstoffwerten widerspiegelt.

B. Verfügbarkeit des TBM-Antigens in verschiedenen Stämmen und deren Segregation

Zur Testung von TBM-Immunseren wurde üblicherweise BN-Niere als Standardmaterial verwendet. Es fiel sehr bald auf, daß sich z.B. Lewis-Nieren, die sich nach den soeben berichteten Befunden in vivo TIN-negativ verhalten, mit solchen Seren nicht anfärben. Dies gab Veranlassung, eine Vielzahl von Inzuchtstämmen auf ihre Antikörper-Bindungsfähigkeit mit bekannt positiven Seren in der indirekten Immunfluoreszenz zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle IX dargestellt.

Tabelle IX: Antikörper-Bindungsfähigkeit der TBM von Normalnieren verschiedener Haplotypen, untersucht mit einem positiven Referenzserum

	a	d	e	l	n	w	?
TBM pos.	ACI AVN DA	BDV	BDVII	BS	BN	LOU	COP
TBM neg.	LEW.1A	LEW.1D		AS Lewis	LEW.1N	LEP	

Die Tabelle zeigt die gleiche Beobachtung, wie schon bei immunisierten Tieren. Trotz Zugehörigkeit zum gleichen

RT 1 - Haplotyp, verhalten sich die einzelnen Stämme unterschiedlich. Im Wesentlichen sind es die Stämme mit Lewis-Background, die über das TBM-Antigen offensichtlich nicht verfügen.

In einer unabhängigen Serie wurden im gleichen Testsystem Segregationsuntersuchungen gemacht. Verwendung fanden die F_2-Generation der Kreuzung (AVN x LEP), sowie F_2-Tiere und Rückkreuzungen der Kombination (Lewis x BN) (Tab. X)

Tabelle X: Unabhängigkeit der TBM-Positivität vom RT 1 - Haplotyp bei

	Haplotyp	TBM pos.	TBM neg.	Total
a) (AVN x LEP) F_2-Tieren	a/a	6	3	9
	a/w	17	5	22
	w/w	9	3	12
b)*) (Lewis x BN)-F_2- und Backcross-Tiere	l/l	5	6	11
	l/n	16	2	18
	n/n	9	-	9

*) Diese Kombinationen wurden direkt durch Immunisierung getestet

Die Verfügbarkeit des TBM-Antigens ist ganz eindeutig nicht vom Histokompatibilitätstyp bestimmt. Falls eine RT 1 - Abhängigkeit gegeben wäre, müßte sich ein Verteilungsungleichgewicht für die verschiedenen Haplotypen ergeben; die ist nicht der Fall.

C. Kompetenz zur TBM-Antikörperbildung bei verschiedenen Stämmen

In diesem Abschnitt wurde versucht festzustellen, ob die TBM-negativen Stämme mit Lewis-Background die Fähigkeit zur Antikörperbildung haben. Tieren, die unter Standardbedingungen (4 mg Schaf-TBM + CFA) immunisiert waren, wurde nach 2 Wochen Blut abgenommen. Die Seren wurden auf Normalnieren von BN-, Lewis, und Schafnieren mit indirekter Immunfluoreszenz untersucht. (Tab. XI)

Tabelle XI: Antikörperbestimmung immunisierter Ratten an Normalnieren

		Versuchsseren			
Normalniere		Lewis	LEW.1N	LEW.1D	BN
Ratten	BN	+*)	+	+	+
	Lewis	Ø	Ø	Ø	Ø
Schaf		+	+	+	+

*) + bedeutet lineare TBM-Fluoreszenz (vgl. Abb. 36)

Tabelle XI zeigt, daß alle Seren der mit TBM immunisierten Tiere Antikörper gegen TBM enthalten. Nicht nur BN Ratten, die bekanntermaßen eine TIN entwickeln, sondern auch all jene Stämme produzieren Antikörper, die weder eine positive Immunfluoreszenz noch histologische oder funktionelle Kriterien aufweisen, also hinsichtlich einer TIN eindeutig negativ sind. Außerdem ist zu erwähnen, daß die Qualität der gebildeten Antikörper, gemessen an der linearen Fluoreszenz der Membranen, nicht von BN-Seren unterscheidbar ist.

3. Zusammenfassung der genetischen Ergebnisse

1. Die Befunde sprechen für eine Codominanz der TIN-induzierenden Erbanlage. Es ist hochwahrscheinlich, daß ein die Erbanlage codiert. 75 % der F_2-Tiere und 50 % bzw. 100 % der Backcross-Tiere sollten unter diesen Prämissen nach Immunisierung eine positive TBM-Fluoreszenz zeigen. Die Ergebnisse sind unter diesem Gesichtspunkt in Tabelle XII zusammengefaßt:

Tabelle XII: Bewertung der immunhistologischen Befunde der F_2- und Backcross-Tiere unter der Ein-Gen-Theorie bei codominantem Erbgang

	Gesamt-zahl	Zahl Ist	Zahl Soll	Zahl Ist	Zahl Soll
F_2-Hybriden:					
(LEW.1N x BN)	31	23 - 23,3		74,2 - 75	
(LEW.1D x BDV)	44	34 - 33		77,3 - 75	
(AVN x LEP)*)	43	32 - 32,2		74,4 - 75	
(Lewis x BN)	17	13 - 12,8		76,5 - 75	
Backcross-Tiere:					
(Lewis x BN) x BN	11	11 - 11		100 - 100	
(Lewis x BN) x Lew.	10	6 - 5		60 - 50	

*) Tiere nur mittels indirekter Immunfluoreszenz getestet

2. Es bleibt ungeklärt, warum es bei positiver Immunhistologie dennoch zu unterschiedlichen klinischen bzw. histologischen Manifestationen der Erkrankung kommt. Ähnliche

Beobachtungen wurden von Lehman (28) gemacht. Die Vermutung, daß zu geringe Antikörperspiegel daran Schuld seien, können aus unseren Versuchen nicht abgesichert werden, da der Stamm BDV z.B. nach zusätzlicher Pertussis-Gabe dennoch kein anderes Verhalten zeigte.

3. Die Disposition für tubulo-interstitielle Nephritis ist unabhängig vom Major Histocompatibility System (MHS, RT 1). Sie wird offenbar über ein Gen gesteuert, das für die Verfügbarkeit des TBM-Antigens codiert. Tiere mit dem Lewis-Background müssen hier einen genetischen Defekt besitzen, da sie nicht erkranken, aber Antikörper produzieren können.

V. MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER TUBULO-INTERSTITIELLEN NEPHRITIS

1. Versuchsbegründung und -ansatz

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Beweise für die Immunpathogenese der tubulo-interstitiellen Nephritis (TIN) erbracht. Wir haben uns deshalb im letzten Teil dieser Arbeit vorgenommen, mit medikamentöser Immunsuppression den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die TIN hat, wie einleitend bereits erwähnt wurde, eine ähnliche Immunpathogenese, wie sie an den Glomeruli auftritt. Der prozentuale Anteil der Basalmembran-Antikörper-induzierten Glomerulonephritis beim Menschen ist verhältnismäßig klein. Der Pathomechanismus, z.B. des Goodpasture-Syndroms erscheint aber so eindeutig, daß es wert erschien, die klinischen Erfahrungen einer immunsuppressiven Therapie des Goodpasture-Syndroms als Grundlage für unsere Versuche heranzuziehen.

Grundsätzlich bieten sich die drei Möglichkeiten einer Therapie mit Steroiden, Azathioprin und/oder Cyclophosphamid an. Aus einem zusammenfassenden Bericht von J. P. Merrill (38), über die Behandlung menschlicher Glomerulonephritisformen geht hervor, daß der medikamentöse Heilerfolg allgemein bei Glomerulonephritis gering ist, abgesehen von der LE-Nephritis und der Lipoidnephrose. Zwar werden auch bei den übrigen GN-Formen immer wieder Therapieerfolge, wie z.B. durch Dreifachkombination von Azathioprin, Cyclophosphamid und dem Glucocorticoid Prednison beschrieben (42), doch ist die Spontanremissionsrate und die einfache antiphlogistische Wirkung von Steroiden, die selten weggelassen werden, schwer abwägbar. Im Hinblick auf die immunsuppressive Behandlung der besonderen Glomerulonephritis-Form mit Anti-Basalmembran-Antikörpern

(Goodpasture-Syndrom) sind prinzipiell die gleichen Vorbehalte geltend zu machen, zumal gerade hier natürliche Remissionen vorzukommen scheinen. Gemessen an Bestimmungen der zirkulierenden Basalmembran-Antikörper ist besonders Cyclophosphamid erfolgversprechend (7, 23).

Aus der Literatur über die Behandlung experimenteller GN-Formen (27) ergibt sich, daß größtenteils Formen mit Immunkomplexpathogenese untersucht wurden, die hier nicht zur Debatte stehen. Man kann jedoch daraus entnehmen, daß die Antikörperbildung der Ratten mit heterologer Immunkomplex-Nephritis durch Azathoprin soweit hemmbar ist, daß keine signifikante Proteinurie mehr auftritt (10). Allerdings läßt sich dieser Effekt nur erzielen, wenn der Therapiebeginn vor oder mit Immunisierung der Tiere stattfindet. Eine Wirkung von Steroiden ließ sich nicht zeigen. In anderen Untersuchungen wurde damit jedoch ein positiver Effekt auf die Eiweißausscheidung bei nephrotoxischer GN gefunden (40). Nach gegenteiligen Befunden von Lim und Spargo (33) hat Prednison auch in hohen Dosen keine Wirkung bei der HEYMANN-Nephritis von Ratten. Im Hinblick auf therapeutische Beeinflussung unseres Modells einer tubulointerstitiellen Basalmembran-Reaktion liegen unseres Wissens keine Voruntersuchungen vor.

Wir haben uns deshalb bei der Planung unserer Versuche zum nichtkombinierten Einsatz der drei Substanzen Imurek^{R}, Endoxan^{R} und Solu-Decortin H^{R} entschlossen. Dabei sind bezüglich der immunsuppressiven Eigenschaften die folgenden Charakteristika entsprechend einer Übersicht von P. A. Miescher et al. im "Textbook of Immunopathology" (39) zu erwarten:

Tabelle XIII: Wirkung verschiedener Immunsuppressiva

	Azathioprin (Imurek^{R})	Cyclophosphamid (Endoxan^{R})	Prednisolon (Solu-Decortin H^{R})
	Antimetabolite	Alkylantien	Glucocorticoide
Wirkweise:	Fehlsynthese der Nucleins.	alkylierende Verbindung von Nucleinsäuren	unklar (dosisabhängig)
Wirkungen:			
allg.:	---antiphlogistisch---		
spez.:	induktive Phase der Immunantwort	lymphocytolyt. (B-Zellen)	prim. sek. Immunantwort
	(kaum Antikörpersynthese)	primäre (sek.) Immunantwort	

Für den Therapieversuch wurden 3 Gruppen von BN-Ratten beiderlei Geschlechts gebildet (Tab. XIV)

Tabelle XIV: Versuchsanordnung des Therapieversuchs

	Anzahl d. Tiere	Immunisiert	Therapeutikum	Dosis	Intervall
Versuchstiere					
Gr. I	5	+	Az	8 mg/kg	jeden 2.Tag
Gr. II	5	+	Cy	8 mg/kg	jeden 2.Tag
Gr. III	5	+	Pred	8 mg/kg	jeden 2.Tag
Kontrollen					
ohne Therapie					
TIN pos	2	+	Ø	Ø	Ø
ohne Antigen:					
Az	1	Ø	Az	8 mg/kg	jeden 2.Tag
Cy	1	Ø	Cy	8 mg/kg	jeden 2.Tag
Pred	1	Ø	Pred	8 mg/kg	jeden 2.Tag

Die Medikamente wurden intraperitoneal injiziert. Zur genauen Dosierung der Medikamente wurden alle Tiere vor jeder Injektion gewogen. Der erste Tag der Therapie war der Tag der Immunisierung, nach Standardbedingungen in CFA. Die Therapiedauer betrug insgesamt 6 Wochen ohne Unterbrechung.

Die Auswertung der Untersuchung erfolgte durch histologische und immunhistologische Befundung. Dazu wurde von jedem Tier 3 Wochen nach Versuchsbeginn Biopsiegewebe entnommen. Unmittelbar nach Therapieende (6 Wochen) wurde die Hälfte der Tiere der Therapiegruppen getötet und die gesamte Niere untersucht; die übrigen Tiere wurden erst nach 13 Wochen getötet. Zusätzlich wurden Blutproben in der 1., 3. und 5. Woche und bei Versuchsende gewonnen und der Serumharnstoff bestimmt. Von jeweils 2 Seren pro Gruppe wurde außerdem die Konzentration zirkulierender Antikörper gegen TBM bestimmt.

2. Ergebnisse

Äußerlich waren alle Tiere während der Versuchsdauer unauffällig; auch die Gewichtskontrollen zeigten keine wesentlichen Schwankungen. Bei der makroskopischen Inspektion der Nieren waren nach 3 Wochen Unterschiede festzustellen: Während alle Tiere der Gruppen I und III (Azathioprin und Prednisolon), sowie auch der TIN-Kontrollen, die bekannten, typischen herdförmigen Veränderungen aufwiesen, waren alle übrigen unauffällig (Gruppe II und Therapie-Kontrollen). In gleicher Weise verhielt es sich zum Zeitpunkt der terminalen Nephrektomie.

Histologisch war dieser makroskopische Befund zu bestätigen: Nach 3 Wochen wiesen alle 5 Tiere der Gruppe I

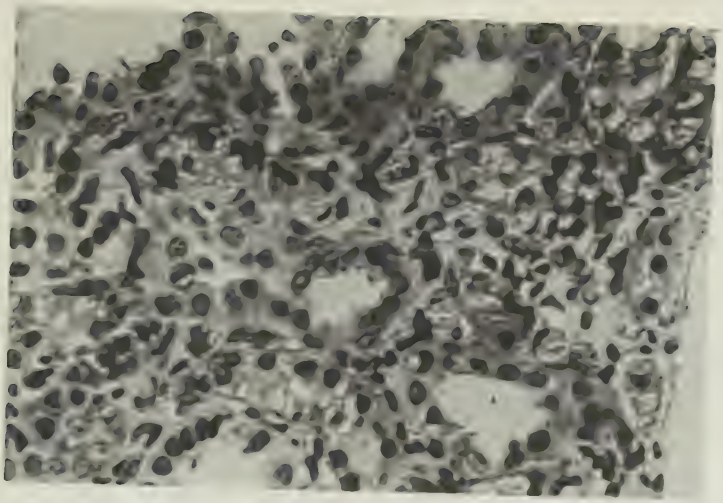


Abb.38: Azathioprin-Therapie: Tubulusatrophie, interstitielle Rundzellen
PAS - Färbung

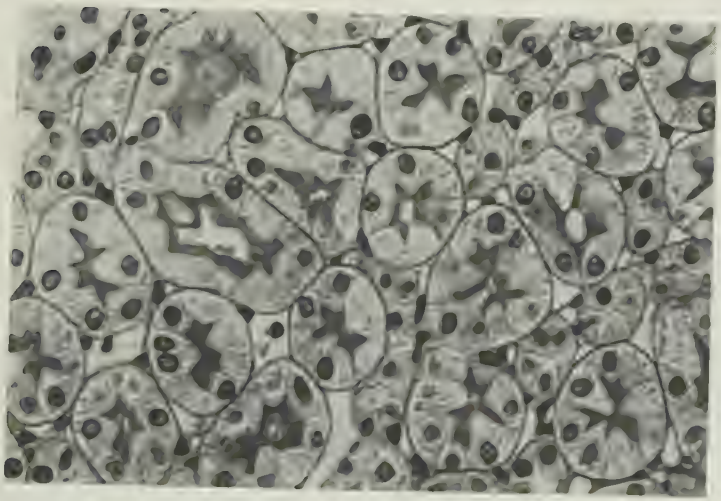


Abb.39: Cyclophosphamid-Therapie: keine pathologischen Veränderungen
PAS - Färbung

(Azathioprin) quantitativ unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen einer tubulo-interstitiellen Nephritis auf: Herdförmige Tubulusatrophie neben subcapsulär betonten Rundzellinfiltraten und peritubulären Riesenzellen mit Basalmembranfragmenten (Abb. 38). Eine vaskuläre oder glomeruläre Beteiligung lag nicht vor. Gleichartige Befunde ließen sich auch bei der Gruppe III (Prednisolon) und bei den TIN-Kontrollen erheben. Im Gegensatz dazu waren bei Gruppe II (Cyclophosphamid) keine pathologischen Veränderungen festzustellen (Abb. 39). Dies traf auch für die Therapie-Kontrollen zu.

Die Nieren, die unmittelbar nach Ende der Therapie (6 Wochen) entnommen wurden, wiesen histologisch dieselben Ergebnisse auf: Gruppe I und Gruppe III zeigten interstitielle entzündliche Veränderungen, wobei zu diesem Zeitpunkt vor allem die TBM-Veränderungen augenfällig sind. Bei Gruppe II sind histologisch keine Entzündungen vorhanden.

In den Nieren 12 Wochen nach Versuchsbeginn haben sich histologisch keine weiteren Veränderungen in der Gruppenverteilung eingestellt: Bei den bisher positiven Tieren sieht man nur noch restliche interstitielle Infiltrate. Die bisher negativen Tiere, zu denen auch die der Gruppe II (Cyclophosphamid) gehören, zeigen keine Veränderungen, die auf eine verspätet angelaufene Nephritis hindeuten würden.

Immunhistologisch zeigen die Gruppen I und III, wie zu erwarten, nach 3, 6 und 12 Wochen typisch-IgG-positive Tubulusbasalmembranen mit stellenweise starker TBM-Destruktion. Gerade in diesen Bereichen findet sich zum Zeitpunkt 3 Wochen eine herdförmig verstärkte C3-Anfärbung. Die Nieren-

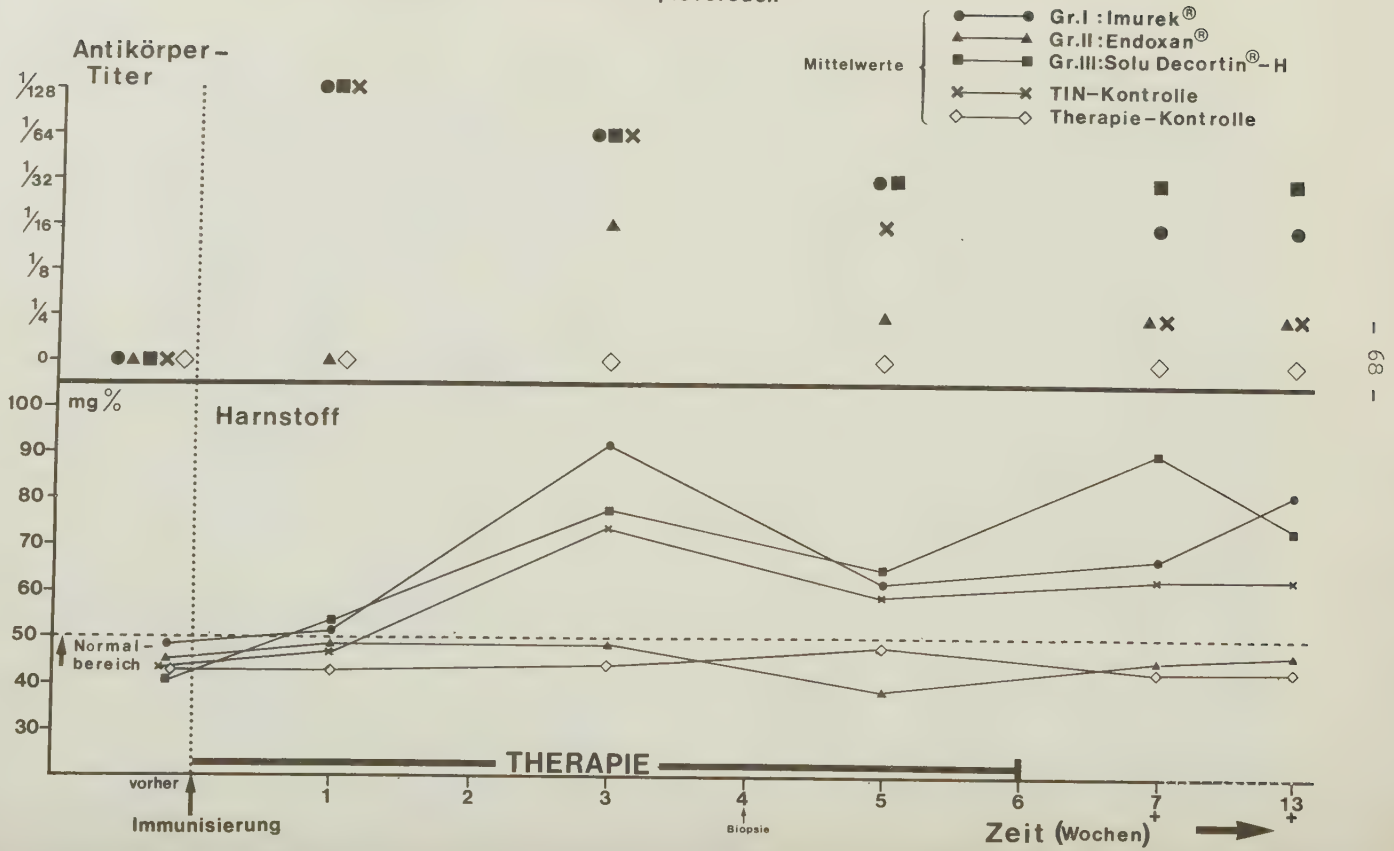
schnitte der Gruppe II (Cyclophosphamid) hingegen zeigen nach 3 Wochen keine oder nur sehr schwache, herdförmige TBM-Fluoreszenz mit IgG. Spezifische C3-Befunde sind nicht zu erheben. Nach 6 Wochen kann man dann aber eine etwas stärkere TBM-Fluoreszenz, im Vergleich zur Biopsie feststellen, wobei Unterschiede von Tier zu Tier bestehen. Diese Entwicklung ist auch nach 12 Wochen (= 6 Wochen nach Therapieende) deutlich, denn die Fluoreszenzstärke der TBM ist nur mehr gering von derjenigen bei Gruppe I und III verschieden. Überzeugende Befunde einer Complementablagerung sind jedoch nicht festzustellen.

Die serologischen Parameter sind in Text-Fig. 4 dargestellt. Man sieht, daß die Serumharnstoffwerte im Vergleich der Gruppenmittelwerte Unterschiede aufweisen. Während die Werte der Gruppen I und III, sowie der TIN-Kontrolle, über dem Normalbereich liegen, sind die Harnstoffwerte bei Gruppe II, wie auch bei den Therapiekontrollen im Normbereich.

Die Konzentrationen der Basalmembranantikörper sind vor Versuchsbeginn negativ. Nach der ersten Woche finden sich in den Gruppen I, III und den TIN-Kontrollen Antikörper mit einem Titer von 1 : 64 bis 1 : 128, in der Gruppe II dagegen ist der Nachweis noch negativ. Die Antikörpertiter fallen im Verlauf der nächsten Wochen ab. Bei Gruppe II zeigt sich ein anderes Bild: Erst bei der Blutabnahme nach 3 Wochen ist ein niedriger TBM-Antikörpertiter anzutreffen, der im weiteren Verlauf auf Werte von 1 : 4 weiter absinkt, aber persistiert. Die Titerangaben sind für beide Tiere gleich. Bei den Therapie-Kontrollen sind zu keiner Zeit TBM-Antikörper nachweisbar.

Text-Figur 4 Tubulo-interstitielle Nephritis

Therapieversuch



3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der Versuch unternommen, mit Immunsuppressiva verschiedener Substanzklassen die Entwicklung der TIN vom Anti-BM Typ zu verhindern. Die Ergebnisse sind in Tab. XV zusammengefaßt dargestellt. Mit Cyclophosphamid kann man bei Ratten die Entwicklung einer TIN unterdrücken, mit Azathioprin und Prednisolon gelingt dies nicht.

Betrachtet man als Maßstab immunologischer Aktivität den Antikörpertiter, bzw. den in-vivo-Nachweis der TBM-Antikörper nach 6 und 12 Wochen, so muß eine immunologische Sensibilisierung konstatiert werden. Die Diskrepanz zwischen Histologie und Funktion einerseits, und Immunfluoreszenz andererseits, dürfte am ehesten eine quantitative Erklärung haben. Die Interpretation liegt nahe, daß eine unzureichende Antikörperbildung unter Cyclophosphamid erzielt wird, bei der eine manifeste tubulo-interstitielle Nephritis nicht entsteht. Auch die Beendigung der Therapie ändert daran nichts mehr.

Tabelle XV: Vergleichende Übersicht der Befunde bei tubulointerstitieller Nephritis (TIN) unter immunsuppressiver Therapie

nach:	(IgG) Immunfluo.	Histologie	TBM-AK-Titer
a) 3 Wochen			
Az	+++ *)	+	1 : 64
Cy	(+)	Ø	1 : 16
Pred	+++	+	1 : 64
TIN-Kontrolle	+++	+	1 : 64
Therapiekontrolle	Ø	Ø	Ø
b) 6 Wochen (= Therapieende)			
Az	+++	+	1 : 16
Cy	+	Ø	1 : 4
Pred	+++	+	n.d. **)
TIN-Kontrolle	+++	+	n.d.
Therapiekontrolle	Ø	Ø	Ø
c) 13 Wochen			
Az	+++	+	1 : 16
Cy	++	Ø	1 : 4
Pred	+++	+	1 : 32
TIN-Kontrolle	+++	+	1 : 4
Therapiekontrolle	Ø	Ø	Ø

*) Anzahl der + bedeutet eine ungefähre Wichtung der Immunhistologischen Befunde ja nach Fluoreszenzstärke

**) nicht durchgeführt

VI. DISKUSSION

Die glomerulären Affektionen der Niere stehen seit Jahrzehnten im Zentrum der Immunpathogenese-Forschung. "Despite (or perhaps as a result of) this concentrated study of glomerular injury, relatively little attention has been given to immune injury to extraglomerular renal structures" (31). Im Laufe der letzten Jahre wurde dagegen vermehrt berichtet über Immunprodukte im Interstitium menschlicher Nieren, meist allerdings im Zusammenhang mit glomerulären Prozessen. Ein isoliertes Vorkommen immunologisch induzierter, interstitieller Nierenentzündungen in der Humanpathologie scheint dennoch relativ selten zu sein. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, experimentell eine nicht-bakterielle, interstitielle Entzündung zu induzieren, um deren eigenständige, pathogenetische Bedeutung besser beurteilen zu lernen. Zur Verwirklichung dieses Vorhabens wurden Inzuchtratten mit heterologer Schaf-TBM immunisiert. Dies führt in Übereinstimmung mit ähnlichen Versuchen von Lehman et al. (28) und Robertson et al. (43) zur Entwicklung einer tubulo-interstitiellen Nephritis (TIN).

Betrachtet man dabei die initialen pathogenetischen Abläufe, so ist nach einer Latenz von wenigen Tagen bei einmaliger Antigenbehandlung die Ablagerung von IgG der erste faßbare Parameter. Der kurze Zeitraum spricht für eine antikörper-vermittelte Immunreaktion. In der Immunfluoreszenz sieht man eine diffuse, lineare Anfärbung der cortikalen TBM, während das gesamte Mark frei bleibt. Dies spricht für eine hohe und selektive Spezifität der antigenen Eigenschaften proximaler tubulärer Basalmembranen. Nur kurze Zeit später wird am Ort der Antikörperbindung der Complementfaktor C3 abgelagert, mit der Einschränkung, daß keine diffuse, sondern eine herdförmige Fixierung mit Be-

tonung der äußeren Rindenschichten stattfindet. Diese herdförmige Complementbindung korreliert zum anfänglich herdförmig ausgebildeten morphologischen Befund. Die Complement-Aktivierung dürfte als Folge einer Antigen-Antikörper-Reaktion gewertet werden, jedoch bleibt die unterschiedliche Ausdehnung der C3-Ablagerungen, verglichen mit den IgG-Befunden, unklar. Daß die Entzündung aber überwiegend Complement-vermittelt abläuft, wurde in Untersuchungen von Rudofsky et al. am Meerschweinchen belegt: Tiere mit künstlich gesenktem C3-Spiegel entwickeln das Vollbild einer TIN nicht (45). Hingegen ist C4, ein Complementfaktor der "klassischen Aktivierung", dafür nicht notwendig (44). Die Bedeutung des sog. "alternate pathway" der Complement-Aktivierung wurde erst jüngst durch den Nachweis von C3PA, einer C3-Vorstufe, unterstrichen (49). Ohne zeitliche Verschiebung tritt am Ort des Complementverbrauchs eine charakteristische , dichte, herdförmige Granulozyteninfiltration auf. Auffällig ist dabei anfänglich die subcapsuläre Ausdehnung der Infiltrate, wodurch die Frage nach der Bedeutung der stark hervortretenden Nieren-Kapselgefäße aufgeworfen wird. Diese sind im Bereich der Entzündungsareale makroskopisch sichtbar. (Persönliche Mitteilung Prof. Langer, Mainz). Auf welchem Weg auch immer die Hauptmenge Antikörper und Complement an ihren Zielort gelangt, der pathogene Reiz dürfte chemotaktischer Natur sein und zum Einströmen von Granulozyten führen. Ob diese massenhafte Zellanhäufung die Tubuli zusätzlich durch die Ausweitung des Interstitium und Unterbindung einer normalen Blutversorgung schädigt, wäre denkbar und würde zusätzlich zur Einwirkung granulozytärer Enzyme die zentralen Nekrosen im Entzündungsbereich erklären. Auch ließe sich mit der Unterbindung einer normalen Blutzirkulation erklären, daß eine Complement-Bindung herdförmig erfolgt. Bei dem sich anschließenden Übergang

in eine diffuse Infiltration scheinen auch die unterschiedlichen Adjuvantien eine Rolle zu spielen: Nur eine zusätzliche B.Pertussis-Applikation, zugleich mit Immunisierung der Tiere, kann eine solche quantitativ stärkere Infiltration induzieren, verglichen mit alleiniger CFA-Anwendung. In diesem Zusammenhang bleibt zu erwähnen, daß beiden Immunstimmulantien nur eine unspezifische Hilfsfunktion zukommt: Auch ohne Adjuvans läßt sich beim Meerschweinchen in sehr hoher Antigendosierung eine TIN induzieren (48). Dieser Gesichtspunkt wurde im vorliegenden Modell und in dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt, muß aber bei weiteren Untersuchungen Verwendung finden. Adjuvans allein führt, wie unsere Kontrolltiere zeigen, zu keiner Entzündung. Interessanterweise treten Granulozyten bei der TIN der Meerschweinchen zu keiner Zeit auf (20, 64), was auf gewisse Speziesunterschiede hinsichtlich zellulärer Reaktion hindeuten könnte. Bei der TIN des Meerschweinchens werden von Anfang an in den infiltraten Rundzellen beobachtet, die in unserem Modell erst am Übergang zur Restitutionsphase zu finden sind. Hier treten, neben Lympho- und Histiozyten, gehäuft Rundzellen auf, die vermutlich im Zusammenhang mit dem Abbau zugrundegegangener Tubuli zu erklären sind. Während im Rahmen unserer Experimente zellulär-immunologische Reaktionen für den Ablauf der TIN keine Rolle zu spielen scheinen, wird die grundsätzliche Bedeutung immunkompetenter lymphoider Zellen durch Versuche am Meerschweinchen deutlich: Tiere, die durch Bestrahlung lymphozyten-frei gemacht wurden, können nur dann an einer TIN erkranken, wenn sie mit Knochenmarkzellen substituiert werden (46, 47). Der Zellgehalt der Infiltrate nimmt in unserem Modell im Verlauf deutlich ab, obwohl bemerkenswert zahlreich Plasmazellen persistieren. Die auch im Spätstadium vorhandenen IgG-Ablagerungen können als Ausdruck andauernder, lokaler Plasmazellaktivität gedeutet werden.

Während des gesamten Ablaufs des Entzündungsprozesses läßt sich klinisch eine mittelgradige Serum-Harnstofferhöhung ermitteln, die ihre Ursache im herdförmigen Untergang proximaler Tubuli haben dürfte. Hingegen stimmt das unveränderte Harnkonzentrierungsvermögen damit überein, daß das Nierenmark am Entzündungsgeschehen nicht beteiligt ist. Ebenso weisen normale Serumkreatininwerte auf die funktionsfähig bleibenden Glomeruli hin. Es ist allerdings zu bedenken, daß die insgesamt geringe Funktionseinschränkung bei unseren Versuchen spezies-eigentümlich sein kann. Beim Meerschweinchen lassen sich nämlich im Rahmen der TIN zahlreiche, eingeschränkte Funktionsparameter finden (20). Bei der Untersuchung der Spezifität der Antikörper, die die TIN induzieren, fiel auch bei in-vitro-Testung (IIF, Niereneluat), ähnlich den in-vivo-Befunden, auf, daß sie selektiv an der Ratten-TBM anlagern und die GBM aussparen. Dies dürfte als weiterer Beweis für die antigene Eigenständigkeit der TBM anzusehen sein. Andererseits reagieren diese Antikörper auch mit Schafniere kreuz, was nicht verwunderlich ist, da mit TBM dieser Spezies die Immunisierung der Ratten erfolgte. Dabei lagern sie in-vitro sowohl an der (heterologen) TBM wie GBM an. Dies könnte bedeuten, daß entweder die Schaf-TBM-Präparation, mit der die Ratten immunisiert wurden, mit GBM partiell verunreinigt war oder, daß, analog zu Untersuchungen von Lehman (30), beide Membranstrukturen beim Schaf gemeinsame, vielleicht kollagene, Komponenten besitzen, die der Ratten-Antikörper erkennt. Bei dem Versuch, die pathogenetische Bedeutung des Antikörpers mittels eines Serumtransfers, Ratte in Ratte, nachzuweisen, hat sich gezeigt, daß damit das Vollbild der TIN nicht zu induzieren ist: Nur in der Immunfluoreszenz wird der Antikörper nachweisbar. Man kann diskutieren, daß es sich hierbei wieder um eine speziesabhängige Eigentümlichkeit der Ratte handelt, denn mit Meerschweinchen konnte gezeigt werden, daß ein Antikörpertransfer einer Direkt-

immunisierung, bezogen auf die Effektivität, gleichzusetzen ist (55). Bei diesen Tieren wurde erst jüngst nachgewiesen, daß in ihnen nach Transfer fremder Antikörper eine zusätzliche, körpereigene Antikörperproduktion anläuft (16). Ob bei der Ratte diese Stimulation ausbleibt und deshalb ein Antikörpertransfer immer ineffektiv ist, muß offen bleiben.

Da nicht alle immunisierten Rattenstämme an einer TIN erkrankten, interessierte, ob eine genetische Disposition dafür vorliegt. Die vorgelegten Untersuchungen haben dies bestätigt und darüberhinaus gezeigt, daß die Erkrankung höchstwahrscheinlich durch ein Gen gesteuert wird, das aber nicht im Bereich des RT 1 - Lokus gelegen ist. Dadurch unterscheiden sich unsere Befunde der TIN von bisherigen genetischen Untersuchungen an der Ratte, bei denen eine Kopplung experimenteller Erkrankungen an das MHS gezeigt wurde (9, 12, 13, 57, 58). Auch aus diesen Berichten geht hervor, daß für die jeweilige Erkrankungsdisposition auch andere Genloci berücksichtigt werden müssen: In Untersuchungen von Stenglein et al. (58) wird in diesem Zusammenhang die Bedeutung der schwachen Antigene des sog. "Lewis-background" diskutiert. Da auch in unserem Experiment alle Tiere mit solchem genetischen Muster TIN-negativ sind, könnte man postulieren, daß bei ihnen auf Grund eines ingezüchteten, genetischen Defekts das TIN-codierende Gen nicht mehr existiert. Eine Ausnahme hiervon bilden einige F_2- und Rückkreuzungstiere, die homozygot den Lewis-Haplotyp besitzen (siehe Tab. VII) und trotzdem über eine positive TBM verfügen. Für dieses Verhalten wäre die Möglichkeit einer Rekombination des genetischen Materials im Rahmen der Weitervererbung oder überhaupt der MHS-unabhängige Erbgang der TIN-Erbanlage in Betracht zu ziehen.

Die Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, daß die Verfügbarkeit des TBM-Antigens ein limitierender Faktor der Krankheitsinzidenz ist: Nur Tiere, die über das TBM-Antigen verfügen, können erkranken. Diese Befunde unterscheiden sich von Ergebnissen bei der HgCl-induzierten GN in Inzuchtratten deutlich (9). Darin wird festgestellt, daß alle Stämme über das GBM-Antigen verfügen und nur der Immunantwort eine entscheidende Bedeutung zukommt. Auf eine solche Kopplung an "immune response"-Gene führt auch Hyman (21) hauptsächlich die Induzierbarkeit einer TIN bei ingezüchteten Meerschweinchen zurück. Eine solche genetisch verankerte Immunantwort ist bei unseren Versuchen sicherlich nicht der entscheidende Faktor gewesen, da die negativen Rattenstämme über das nephritogene Antigen der TBM gar nicht verfügen. Ob jene Stämme, die zwar Antikörper anlagern, aber nicht das Vollbild der TIN entwickeln, einer zusätzlichen genetischen Steuerung der Immunantwort unterliegen, kann aus den vorliegenden Versuchen nicht entschieden werden.

Der Versuch, die Entwicklung einer TIN bei BN-Ratten mit Immunsuppressiva zu unterdrücken, hat gezeigt, daß nur Cyclophosphamid hierfür geeignet ist. Trotz dieses Therapieerfolges sollten bei der Bewertung einige generelle Prinzipien der immunsuppressiven Therapie berücksichtigt werden (51): Immunsuppressiva besitzen eine spez.spezifische Wirkung, wobei gerade Cyclophophamid bei Ratten einen hohen Aktivitätsindex hat. Dies bedeutet, daß dieser experimentelle Erfolg nicht ohne weiteres auf eine andere Spezies, wie den Menschen, übertragbar ist. Der zusammen mit Immunisierung stattfindende Therapiebeginn stellt einen nur experimentell erreichbaren Idealzustand dar. So könnte ein verspäteter Therapiebeginn, was der Regelfall im klinischen Bereich sein dürfte, ganz andere Ergebnisse zeitigen. Sogar

paradoxe, immunstimmulierende Wirkungen sind bei Immunsuppressiva beschrieben (50, 60). Diese These wird zusätzlich durch Beobachtungen an Inzuchtmäusen belegt (14), wobei nur Cyclophosphamid immunsuppressiv wirkt, während Azathioprin möglicherweise durch Inhibierung von Suppressor-T-Zellen die Antikörperproduktion ankurbelt. Interessanterweise entwickeln diese Inzuchtmäuse auch von sich aus eine zellvermittelte, interstitielle Nephritis (19). Diese läßt sich, ähnlich unserem Therapiemodell, mit Cyclophosphamid unterdrücken (18), was als weiterer Beweis für die Effektivität dieses Medikments bei interstitiellen Nierenentzündungen gewertet werden kann.

Eine Gesamtwertung der vorliegenden Untersuchungen kommt zur folgenden Feststellung: Selektive, tubulo-interstitielle Erkrankungen der Niere sind aufgrund membrantoxischer, complementfixierender Antikörper induzierbar, wenn entsprechende genetische Disposition vorliegt, und sind durch Blockierung der Antikörpersynthese (Alkylantien) zu verhindern. Vorsichtig ausgedrückt muß man sagen, daß das vorliegende Modell beim Menschen kein sehr in Erscheinung tretendes Korrelat hat. Wir meinen jedoch, daß die Feststellung einer so hohen und selektiven antigenen Spezifität der tubulären Basalmembran den früheren grundlegenden Erkenntnissen über glomerulotoxische Basalmembranantikörper vergleichbar ist. Wir sehen einen besonderen Erfahrungszuwachs darin, daß Autoimmunreaktionen auch in ungewohnt foudvoyanter Weise ablaufen können. Auch hierfür findet sich beim Menschen kein angemessenes Korrelat, abgesehen vom Goodpasture-Syndrom. Entscheidend ist nach unserer Ansicht, daß Antigenausbildung und Immunantwort einer genetischen Determinierung unterliegen. Auch die Art der entzündlichen Reaktion (granulozytär.lymphozytär)

dürfte stark speziesabhängig sein. Wir betrachten deshalb das vorliegende Modell und seine Ergebnisse als eine Bestätigung der Annahme, daß interstitielle Prozesse an der Niere eine eigenständige Bedeutung haben können und deshalb größere forscherische Aufmerksamkeit verdienen als in der Vergangenheit geschehen.

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, daß Abstoßungskrisen von Nierentransplantaten dadurch vorgetäuscht werden können (eigene Beobachtung), daß ein Transplantatempfänger Antikörper gegen die allogene TBM der Spenderniere bildet, die das Immunsystem des Empfängers als fremd erkennt. Es erscheint deshalb möglich, daß über die detailliertere Untersuchung tubulo-interstitieller Veränderungen in Transplantatnieren des Menschen weitere Aufklärung über die Krankheitseigentümlichkeiten des Niereninterstitium des Menschen erreichbar sind. Wir sehen daher auch weitere experimentelle Ansätze in Richtung auf eine, sich selbst perpetuierende, chronisch-interstitielle Erkrankung in der Verwendung allogener und syngener TBM im Rattenmodell. Es ist denkbar, daß dadurch die klinische Relevanz der Modellversuche erhöht wird,indem Reaktionsarten gefunden werden, die der Humanpathologie näher kommen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Während lange Zeit die glomerulären Affektionen der Niere im Zentrum der Immunpathogenese-Forschung standen, wurde im Laufe der letzten Jahre vermehrt über extraglomeruläre Immunprozesse berichtet, wobei deren isoliertes Auftreten nur selten beobachtet wurde. Auf Grund dieser Tatsache und vor dem Hintergrund der ungeklärten Problematik chronischer, interstitieller Nierenerkrankungen, hatten wir uns die Aufgabe gestellt, experimentell eine isolierte Anti-Tubulusbasalmembran (TBM)-Nephritis (TIN) an Inzuchtratten zu induzieren. An diesem Modell sollte die eigenständige, pathogenetische Bedeutung interstitieller Immunprozesse, die genetische Disposition zur Erkrankung und deren therapeutische Beeinflußbarkeit untersucht werden. Als Voraussetzung dazu wurde aus Schafnieren die corticale TBM isoliert und für die Versuchsauswertung Methoden der Immunfluoreszenz, Histologie und Nierenfunktionsmessung herangezogen. Die Immunisierung des Inzuchtrattenstammes BN mit heterologer Schaf-TBM unter verschiedenen Adjuvansbedingungen zeigte, daß, mit einer Latenz von nur wenigen Tagen, selektiv an der TBM der Nierenrinde Ablagerungen von IgG zu beobachten sind. Unter Complement(C3)-Aktivierung treten in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang Granulozyten in Erscheinung. Der gesamte Prozeß stellt somit eine klassische Antigen-Antikörper-Complement-vermittelte, akut-entzündliche, granulozytäre Reaktion am Tubulus dar. Im weiteren Verlauf klingt die Entzündung unter Narbenbildung ab, wobei die Granulozyten durch wenige, persistierende Rundzellen ersetzt werden. Als klinischer Ausdruck der Nierenschädigung stellt sich eine mittelgradige Serumharnstofferhöhung ein. Bei der Frage nach der genetischen Disposition der Erkrankung hat sich herausgestellt, daß ein Gen, das vom MHS der Ratte unabhängig ist, den Erbgang der

TIN steuert. Es codiert die Verfügbarkeit des TBM-Antigens, das bei einigen Inzuchtrattenstämmen nicht verfügbar ist. Die genetische Determinierung der Immunantwort ist bei diesem Modell offenbar zweitrangig. Ein Versuch, die Entwicklung derTIN mit Immunsuppressiva in Monotherapie zu unterbinden, hat gezeigt, daß dies mit Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) möglich ist, mit Azathioprin (Imurek^{R}) und Prednisolon (Solu Decortin^{R} H) jedoch nicht. Cyclophosphamid dürfte dabei die Antikörperproduktion unterdrücken. Wir haben versucht mit diesem Modell die eigenständige Bedeutung von Immunprozessen des Niereninterstitiums, deren genetische Kopplung und therapeutische Beeinflußbarkeit zu beleuchten und damit einen Ausgangspunkt für weitere Experimente zu schaffen, um der Erklärung der chronisch-interstitiellen Nephritis des Menschen näher zu kommen.

LITERATURLISTE

(1) Andres, G. A., McCluskey, R. T.: Tubular and interstitial renal disease due to immunologic mechanisms
Kidney Int. 7:271, 1975

(2) Andres, G., Brentjens, J. Kohli, R., Anthone, R., Anthone, S., Baliah, T., Montes, M., Mookerjee, B. K., Prezyna, A., Sepulveda, M., Venuto, R., Elwood, Ch.: Histologie of human tubulo-interstitial nephritis associated with antibodies to renal basement membranes
Kidney Int.13:480,1978

(3) Bergstein, J., Litman, N.: Interstitial nephritis with anti-tubular-basement-membrane antibody
N.Engl.J.Med.292:875,1975

(4) Border, W. A., Lehman, D. H., Egan, J. D., Sass, H. J., Glode, J. E., Wilson, C. B.: Antitubular basement-membrane antibodies in methicillin associated interstitial nephritis
N.Engl.J.Med.291:381,1974

(5) Brewerton, D. A., Caffrey, M., Hart, F. D., James, D. C. O., Nicholls, A., Sturrock, R. D.: Ankylosing spondylitis and HL-A 27
Lancet II:904,1973a

(6) Clark, Shepard: A dialysis technique for preparing fluoreszent antibodies
Virology 20:642,1963

(7) Cohen, L. H., Wilson, C. B., Freeman, R. M.: Goodpasture-Syndrome: recovery after severe renal insufficiency.
Arch.Intern.Med.136:835,1976

(8) Cuatrecasas, P., Anfinsen, C. B.: Affinity chromatography
Ann.Rev.Biochem.40:259,1971

(9) Druet, E., Sapin, D., Günther, E., Feingold, N., Druet, P.: Mercuric chloride-induced anti-glomerular basement membrane antibodies in the rat
Genetic control
Eur.J.Immunol.7:348,1977

(10) Feenstra, K., v. d. Lee, R., Greben, H. A., Arends, A., Hoedemaeker, Ph. J.: Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. II. Influence of medication with Prednisone and Azathioprine: A histologic and immunhistologic study at the light microscopic and the ultrastructural level
Lab.Invest.32:243,1975

(11) Ferwerda, W., Meijer, J. F. M., Eijnden, v. d. D., Dijk, v. W.: Epithelial basement membrane of bovine renal tubuli. Isolation and chemical characterization
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.355:976,1974

(12) Gasser, D. L., Newlin, C. M., Palm, J., Gonatas, N. K.: Genetic control of susceptibility of experimental allergic encephalomyelitis in rats
Science 181:872,1973

(13) Gasser, D. L., Palm, J., Gonatas, N. K.: Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the Ag-B locus of rats
J.Immunol.115:431,1975

(14) Gilliam, J. N., Hurd, E. R.: The differential effects of 6-MP and Cyclophosphamide on immunoglobulin deposition in the skin and kidney of NZB/NZW F_1 mice
J.Immunol.119:1285,1977

(15) Günther, E., Stark, O.: The major histocompatibility system of the rat (Ag-B or H-1 system)
in: The major histocompatibility system in man and animals (ed D.Götze)p.207,
Springer-Verlag, New York

(16) Hall, L. C., Colvin, R. B., Carey, K., McCluskey, R. T.: Passive transfer of autoimmune disease with isologous IgG_1 and IgG_2 antibodies to the tubular basement membrane in strain XIII guinea pigs. Loss of selftolerance induced by autoantibodies
J.Exp.Med.146:1246,1977

(17) Heymann, W., Hackel, D. B., Harwood, S., Wilson, S., Hunter, J.: Produktion of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvant and rat kidney suspensions.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.100:660,1959

(18) Hurd, E. R.: Effect of Cyclophosphamide on interstitial nephritis and tubule cell proliferation in NZB/NZW mice
J.Immunol.119:1552,1977

(19) Hurd, E. R., Ziff, M.: Association of interstitial nephritis with tubule cell injury and proliferation in NZB/NZW mice
Clin.exp.Immunol.32:1,1978

(20) Hyman, L. R., Colvin, R. B., Steinberg, A. D.: Immunopathogenesis of autoimmune tubulointerstitial nephritis. I. Demonstration of differential susceptibility in strain II and strain XIII guinea pigs
J.Immunol.116:327,1976

(21) Hyman, L. R., Steinberg, A. D., Colvin, R. B., Bernard, E. F.: Immunopathogenesis of autoimmune tubulointerstitial nephritis
II. Role of Immune response gene linked to the Major Histocompatibility Complex
J.Immunol.117:1894,1976

(22) Hyman, L. R., Ballow, M., Knieser, M. R.: Diphenylhydantoin interstitial nephritis. Roles of cellular and humoral immunologic injury
J.Pediatrics 92:915,1978

(23) Johnson, J. P., Whitman, W., Briggs, W. A., Wilson, C. B.: Plasmapheresis and immunosuppressive agents in antibasement membrane antibody-induced Goodpasture-Syndrome.
Am.J.Med.64:354,1978

(24) Klassen, J., McCluskey, R. T., Milgrom, F.: Nonglomerular renal disease produced in rabbits by immunization with homologous kidney
Am.J.Path.63:333,1971

(25) Klassen, J., Kano, K., Milgrom, F., Menno, A. D., Anthone, S., Sepulveda, M., Elwood, C. M., Andres, G. A.: Tubular lesions produced by autoantibodies to tubular basement membrane in human renal allografts
Int.Arch.Allergy 45:675,1973

(26) Krisko, I., DeBernardo, E., Sato, C. S.: Isolation and characterization of rat tubular basement membrane
Kidney Int.12:238,1977

(27) Kupor, L. R., Lowance, D. C., McPhaul, J.: Single and multiple drug therapy in autologous immune complex nephritis in rats
J.Lab.Clin.Med.87:27,1976

(28) Lehman, D. H., Wilson, C. B., Dixon, F. J.: Interstitial nephritis in rats immunized with heterologous tubular basement membrane
Kidney Int.5:187,1974

(29) Lehman, D. H., Lee, S., Wilson, C. B., Dixon, F. J.: Induction of antitubular basement membrane antibodies in rats by renal transplantation
Transplantation 17:429,1974

(30) Lehman, D. H., Marquardt, H., Wilson, C. B., Dixon, F. J.: Specificity of autoantibodies to tubular and glomerular basement membranes induced in guinea pigs
J.Immunol.112:241,1974

(31) Lehman, D. H., Wilson, C. B., Dixon, F. J.: Extraglomerular immunoglobulin deposits in human nephritis
Am.J.Med.58:765,1975

(32) Lerner, R. A., Dixon, F. J., Young, F. E., Glassock, R. J.: Isolation and characterization of soluble human glomerular basement membrane (HuGBM) antigens and the demonstration of pathogenic antiglomerular antibody in man.
Federation Proc.26:2718,1967

(33) Lim, V. S., Spargo, B. H.: Immunosuppressive treatment of autologous immune complex nephritis in rats.
J.Lab.Clin.Med.81:661,1973

(34) Lindemann, W.: Sur le mode d'action de certains poissons vénaux.
Ann.Inst.Pasteur 14:49,1900

(35) Mahieu, P., Winand, R. J.: Chemical structure of tubular and glomerular basement membranes of human kidney
Isolation, purification, carbohydrate and amino acid comp.
Eur.J.Biochem.12:410,1970

(36) Mardiney, M. R., Müller-Eberhard, H. J.: Mouse β_{1c}-globulin: Production of antiserum and characterization in the complement reaction.
J.Immunol.94:877,1964

(37) Masugi, M.: Über die experimentelle Glomerulonephritis durch das spezifische Antinierenserum. Ein Beitrag zur Pathogenese der diffusen Glomerulonephritis.
Beitr.Anat.und allg.Path.92:429,1933/34

(38) Merrill, J. P.: Glomerulonephritis (Third part)
N.Engl.J.Med.290:374,1974

(39) Miescher, P. A., Gerebtzoff, A., Lambert, P. A.:
Immunosuppressive Therapie aus "Textbook of Immunopathology" (ed. Miescher, P. A., Müller-Eberhart, H. J.)
Grune & Stratten, p.343,1976

(40) Misra, R. P., Berman, L. B.: Studies on glomerular basement membrane, III. Effects of steroid on membrane chemistry and its protein permeability
Lab.Invest.26:666,1972

(41) Morel-Maroger, L., Kourilsky, O., Mignon, F., Richet, G.: Antitubular basement membrane antibodies in rapidly progressive poststrepto. glomerulonephritis: Report of a case
Clin.Immunol.Immunopathol.2:185,1974

(42) Mukherjee, A. P.: Combined Prednisolone, Azathioprine and Cyclophosphamide treatment for persistent proliferative glomerulonephritis in adults
Lancetl:1350,1971

(43) Robertson, J. L., Hill, G. S., Rowlands, D. T.:
Tubulointerstitial nephritis and glomerulonephritis in Brown-Norway rats immunized with heterologous glomerular basement membrane
Am.J.Pathol.88:53,1977

(44) Rudofsky, U. H., McMaster, Ph.R., Ma Wai-Sai, Steblay, R. W., Pollara, B.: Experimental autoimmune renal cortical tubulointerstitial disease in guinea pigs lacking the fourth component of complement (C4)
J.Immunol.112:1387,1974

(45) Rudofsky, U. H., Steblay, R. W., Pollara, B.: Inhibition of experimental autoimmune renal tubulointerstitial disease in guinea pigs by depletion of complement with cobra venom factor
Clin.Immunol.Immunopathol.3:396,1975

(46) Rudofsky, U. H., Pollara, B.: Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune renal tubulointerstitial disease in the guinea pigs
1. Inhibition of tissue injury in leukocyte-depleted passive transfer recipients
Clin.Immunol.Immunopathol.4:425,1975

(47) Rudofsky, U. H., Pollara, B.: Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune renal tubulointerstitial diesease in guinea pigs
II. Passive transfer of renal lesions by antitubular basement membrane autoantibody and nonimmune bone marrow cells to leukocyte-depleted recipients
Clin.Immunol.Immunopathol.6:107.1976

(48) Rudofsky, U. H.: Studies on the pathogenesis of experimental renal tubulointerstitial disease in guinea pigs
III. The role of adjuvants in the induction of diesease
Clin.exp.Immunol.25:455,1976

(49) Rudofsky, U. H., Esposito, L. L., Dilwith, R. L., Pollara, B.: Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune renal tubulointerstitial disease in guinea pigs
5. Deposition of C3PA on the tubular basement membranes
Clin.Immunol.Immunopathol.8:467,1977

(50) Sahiar, K., Schwartz, R. S.: Inhibition of 19S antibody synthesis by 7S antibody
Science 145:395,1964

(51) Santos, G. W.: Immunosuppressive drugs I
Fed.Proc.26:907,1967

(52) Spiro, G. R., Studies on the renal glomerular basement membrane. Preparation and chemical composition
J.Biol.Chem.242:1915,1966

(53) Steblay, R. W.: Glomerulonephritis induced in sheep and monkeys by injections of heterologous glomerular basement membrane and Freund's adjuvant.
J.Exp.Med.116:252,1962

(54) Steblay, R. W., Rudofsky, U. H.: Renal tubular disease and autoantibodies against tubular basement membrane induced in guinea pigs
J.Immunol.107:589,1971

(55) Steblay, R. W., Rudofsky, U. H.: Transfer of experimental autoimmune renal cortical tubular and interstitial disease in guinea pigs by serum
Science 180:966,1973

(56) Steinbauer-Rosenthal, I., Schattenkirchner, M., Schürer, W., Wank, R., Scholz, S., Schiessl, B., Brandenburg, H., Albert, E. D.: Hl-A 27 in patients with ankylosing spondylitis (AS) Z.Immunitätsforschung, Exp.Klin.Immunol.147:6 (abstr.),1974

(57) Stenglein, B., Thoenes, G. H., Günther, E.: Genetically controlled autologous immune complex glomerulonephritis in rats J.Immunol.115:875,1975

(58) Stenglein, B., Thoenes, G. H., Günther, E.: Genetic controll of susceptibility to autologous immune complex glomerulonephritis in inbred rat strains Clin.exp.Immunol.33:88,1978

(59) Sugisaki, T., Klassen, J., Milgrom, F., Andres, G. A., McCluskey, R. T.: Immunopathologic study of an autoimmune tubular and interstitial renal disease in Brown-Norway rats Lab.Invest,28:658,1973

(60) Swanson, M. A., Schwartz, R. S.: Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence N.Engl.J.Med.277:163,1967

(61) Tung, K. S., Black, W. C.: Association of renal glomerular and tubular immunecomplex disease and antitubular basement membrane antibody Lab.Invest.32:696,1975

(62) Wilson, C. B., Lehman, D. H., McCoy, R. C. Gunnells, J. C., Stickel, D. L.: Antitubular basement membrane antibodies after renal transplantation
Transplantation 18:447,1974

(63) Winer, R. L., Cohen, A. H., Sawhney, A. S., Gorman, J. T.: Sjögren's Syndrome with immune-complex tubulo-interstitial renal disease.
Clin.Immunol.Immunopathol.8:494,1977

(64) Zwieten, van M. J., Bhan, A. K., McCluskey, R. T., Collins, A. B.: Studies on the pathogenesis of experimental antitubular basement membrane nephritis in the guinea pig
Am.J.Pathol.83:531,1976

(65) Zollinger, H. U., Mihatsch, M. J.: Renal pathology in biopsy.
Verlag Springer, ed.1978,p.407

Danksagung

Herrn PD Dr.G.H.Thoenes möchte ich für die Überlassung dieser Promotionsarbeit,seine immer vorhandene Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft danken.

Herr Prof.Dr.M.Eder und PD Dr.K.Pielsticker,München, sowie Prof.Dr.W.Thoenes und Prof.Dr.K.H.Langer,Mainz, haben die Erstellung der histologischen Präparate in ihren Pathologischen Instituten ermöglicht;ihnen bin ich dafür besonders zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr.E.Günther,MPI für Immunbiologie,Freiburg, für seine engagierte Kooperation in genetischen Sachfragen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Mitarbeiterinnen Gela Urban und Inge Doering für die freundliche Aufnahme und technische Unterstützung in unserem Labor.

Lebenslauf

3.April 1952 geboren in München
Vater: Dr.jur. (verstorben 1972)
Mutter: Dr.med.,geb.Rottenkolber
1958 - 62 St.Anna-Volksschule in München
1962 - 71 Hum.Wilhelmsgymnasium in München
1971 Abitur
1971 - 78 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
1978(Frühjahr) Medizinisches Staatsexamen,Approbation
1978(November) Medizinische Klinik Innenstadt der
Universität München,
Immunbiologisches Labor
(angestellt über Sander - Stiftung)